

VESIHALLITUS — NATIONAL BOARD OF WATERS, FINLAND

Tiedotus
Report

174

ULLA-RIITTA SOVERI

**KALOILLA TEHTÄVIEN TOKSISUUSTESTIEN
SOVELTAMISESTA AUTOMAATTISEEN
BIOLOGISEEN TARKKAILUUN**

HELSINKI 1979

ISBN 951-46-4434-4
ISSN 0355-0745

S I S Ä L L Y S

Sivu

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | JOHDANTO | 5 |
| 2. | KALOILLA TEHTÄVISTÄ TOKSISUUSTESTEISTÄ | 7 |
| 2.1 | Kala toksisuustestiorganismina | 7 |
| 2.11 | Kalalajin valinta | 8 |
| 2.12 | Kalan myrkynsietoon vaikuttavia tekijöitä | 10 |
| 2.2 | Koeoloista | 11 |
| 2.21 | Laimennusvesi | 12 |
| 2.22 | Ympäristö | 14 |
| 2.3 | Myrkkyyvaikutuksista | 14 |
| 2.31 | Myrkkyyvaikutuksen yleinen kulku kalalla | 15 |
| 2.32 | Myrkkyyjen yhteisvaikutuksista | 16 |
| 3. | KALOILLA TEHTÄVIEN TOKSISUUSTESTIEN PÄÄTYYPPEJÄ | 18 |
| 3.1 | Letaalitestit | 18 |
| 3.11 | Yleistä | 18 |
| 3.12 | LC50-testit | 19 |
| 3.2 | Subletaalitestit | 20 |
| 3.21 | Käyttäytymisen seuraamiseen perustuvat testit | 22 |
| 3.211 | Aktiivisuus | 22 |
| 3.212 | Uintikyky | 23 |
| 3.213 | Valintatestit | 24 |
| 3.214 | Testien käyttökelpoisuuden arviointia | 25 |
| 3.22 | Hengityksen mittaamiseen perustuvat testit | 26 |
| 3.221 | Hengitysfrekvenssi ja -syvyys | 26 |
| 3.222 | Yskimisfrekvenssi (coughing frequency) | 28 |
| 3.223 | Testien käyttökelpoisuuden arviointia | 29 |
| 3.23 | Kasvu | 30 |
| 3.24 | Infektioalttius | 31 |
| 3.25 | Kertyvyydestit | 31 |
| 3.26 | Lisääntymishäiriöt | 32 |
| 3.27 | Muutokset kudoksissa ja veriarvoissa | 33 |
| 3.28 | Subletaalitestien soveltamisesta | 34 |
| 4. | KOEJÄRJESTELYT | 36 |
| 4.1 | Koekalat | 39 |
| 4.2 | Koelaitteisto | 39 |
| 4.21 | Laitteiston osat | 39 |
| 4.22 | Laitteiston toimintaperiaate | 43 |
| 4.23 | Vesijärjestelyt | 44 |
| 4.3 | Kokeet | 45 |
| 4.31 | Koeolot | 46 |
| 4.311 | Valaistus | 46 |
| 4.312 | Laimennusveden laatu | 46 |
| 4.313 | Kalojen varastointi- ja koealtaan veden lämpötila ja happipitoisuus | 48 |
| 4.32 | Myrkyn syöttö | 49 |
| 4.33 | Kokeiden suoritus ja tulosten analysointi | 51 |
| 4.331 | Kalojen sopeuttaminen ja normaaliarvojen mittaus | 51 |
| 4.332 | Kalojen reagoiminen ja hälytyshavainto | 51 |

| | Sivu |
|--|------|
| 4.333 Kalojen yksilöllisyys ja raskasmetallipitoisuuden vaikutus reagoimisvoimakkuuteen | 53 |
| 4.34 Esikokeet | 54 |
| 4.35 Sinkkikokeet | 55 |
| 4.36 Kuparikokeet | 56 |
| 5. TULOKSET | 57 |
| 5.1 Laitteiston toimivuus | 57 |
| 5.2 Kokeet | 58 |
| 5.21 Sinkkikokeet; kokeet 1-7, 15-18 | 58 |
| 5.22 Kuparikokeet; kokeet 8-14, 19-20 | 70 |
| 5.23 Kalojen yksilöllisyys ja raskasmetallipitoisuuden vaikutus kalojen reagoimisvoimakkuuteen | 81 |
| 6. TULOSTEN TARKASTELU | 82 |
| 6.1 Laitteiston toimivuus | 82 |
| 6.2 Kalojen reagoiminen ja hälytyshavainnot | 85 |
| 6.21 Yleistä | 85 |
| 6.22 Sinkkikokeet | 86 |
| 6.221 Reagoiminen pulssimäärien perusteella | 86 |
| 6.222 Reagoiminen hengitysfrekvenssien perusteella | 88 |
| 6.223 Hälytyshavainnot | 89 |
| 6.224 Vertailua muihin tutkimustuloksiin | 91 |
| 6.23 Kuparikokeet | 92 |
| 6.231 Reagoiminen pulssimäärien perusteella | 92 |
| 6.232 Reagoiminen hengitysfrekvenssien perusteella | 93 |
| 6.233 Hälytyshavainnot | 94 |
| 6.234 Vertailua muihin tutkimustuloksiin | 96 |
| 6.24 Sinkki- ja kuparikokeiden vertailua | 97 |
| 6.25 Kalojen väliset yksilölliset erot | 98 |
| 7. JOHTOPÄÄTÖKSET | 99 |
| 7.1 Laitteiston toimivuus ja kehittämistarve | 99 |
| 7.2 Käytettyjen menetelmien käyttökelpoisuus veden laadun tarkkailuun | 100 |
| 8. TIIVISTELMÄ | 103 |
| KIRJALLISUUS | 105 |
| LIITTEET | |

1. J O H D A N T O

Toksikologia on tiede, joka käsittelee myrkkyjä ja niiden vaikutuksia. MYRKKYLAISSA (309/69) myrkky määritellään aineeksi, joka vähäisinäkin annoksina elimistöön jouduttuaan vaikuttaa kemiallisesti joko välittömästi tai välillisesti aiheuttaen elimistön toiminnan häiriöitä. Myrkkyvaikutuksia voidaan tutkia toksisuus- ja biotestein (= bioassay). DOUDOROFF (1977) määrittelee biotestin kokeeksi, jossa elävien organismien avulla määritetään jonkin voimakkuudeltaan tai aktiivisuudeltaan tuntemattoman, fysiologisesti aktiivisen aineen voimakkuus tai määrä. Biotesti-termin käyttö olisi rajoitettava em. määritelmän mukaisiin kokeisiin ja käytettävä muissa yhteyksissä myrkyllisyyskokeista nimitystä toksisuustesti.

Toksisuustesteillä voidaan tutkia monenlaisia myrkkyjen ja eliöiden välisiä vuorovaikutuksia. BROWN (1976) luettelee eräitä kaloilla tehtävien toksisuustestien tarkoituksia:

- kalan myrkyllisten ominaisuuksien tutkiminen (= kalatoksikologia)
- erilaisten myrkkyjen ja myrkkypitoisuuksien havaitseminen kalojen avulla
- selektiivisten kalamyrkkyjen vaikutusten tutkiminen
- myrkkyjen metabolian tutkiminen
- erilaisten aineiden myrkyllisyyksien vertaileminen erilaisissa koeoloissa ja erilaisia kaloja käyttäen
- jäteveden sisältämien aineiden sallittavien enimmäispitoisuuksien määrittäminen yksinkertaisin laboratoriokein
- erilaisten aineiden kalojen kasvuun, lisääntymiseen, hengissä säilymiseen ym. kohdistuvien vaikutusten selvittäminen laboratoriokein
- jäteveden (tai maataloudessa käytettävien kemikaalien) kaloihin, kalapopulaatioihin ja kalastukseen kohdistuvien vaikutusten tutkiminen laboratorio- ja kenttäkein
- jäteveden haitallisten vaikutusten tutkiminen sumputuskokein
- vesistöistä otettavan käyttöveden (juoma- ja kasteluvesi) laadun tutkiminen kalojen avulla.

Nykyisin kaloilla tehtävien toksisuustestien ehkä tärkein sovellutus on niiden käyttäminen apuna asetettaessa vesistöön päästettävälle jätevedelle laatuvaatimuksia ja seurattaessa jäteveden vaikutuksia vesistössä. Myös puhdistetun jäteveden ja käyttöveden laadun valvonnassa on alettu käyttää kaloja veden laadun muutosten ilmentäjänä: automaattisen fysikaalis-kemiallisen veden laadun tarkkailun rinnalle on tulossa automaattinen biologinen tarkkailu.

Jätevesien biologisten haittavaikutusten laadun tai suuruuden arvioimiseksi ei fysikaalis-kemiallinen vesianalyysi ole riittävä. Kerran kuukaudessa tai viikossa otettu vesinäyte ei kerro, mitä on saattanut tapahtua näytteiden oton välisenä aikana eikä kemiallisella analysoinnilla saada selville jäteveden sisältämien aineiden synergistisiä tai antagonistisia myrkkyyvaikutuksia. Automaattisessa biologisessa tarkkailussa koeorganismi on jatkuvasti jätevedelle tai sen laimennukselle alttiina, jolloin äkillinen veden laadun muutos voidaan havaita nopeasti. Eliöiden reagoimisen aiheuttanutta ainetta ei kuitenkaan kyetä identifioimaan.

Automaattista biologista veden laadun tarkkailua on jo muualla maailmassa mm. USA:ssa ja Keski-Euroopassa sovellettu käytäntöön. Suomessa asia on uusi ja vasta kehittelyasteella. Kevättalvella 1977 rakennettiin vesihallituksen KVT-projektissa hollantilaisen mallin mukaan ensimmäinen automaattinen biologinen tarkkailulaitteisto, jonka käyttökelpoisuutta testattiin kesällä 1977 Kymijoella kolmen kuukauden ajan (SALMELA 1978). Laitteistolla on tarkoitus havaita veden laadun äkillisiä, suuria muutoksia. Jokiveden laadussa ei kuitenkaan tapahtunut testausaikana merkittäviä muutoksia, ja koska laitteisto toimi maastossa melko huonosti, sen käyttökelpoisuuden selvittäminen kaipasi lisätutkimuksia. Laitteisto siirrettiin tarpeellisten korjausten ja muutostöiden jälkeen Kymijoelta vesihallituksen keväällä 1978 valmistuneeseen Kyläsaaren kalalaboratorioon.

Tämän työn tarkoituksena oli testata em. laitteiston toimivuutta ja käyttökelpoisuutta veden laadun äkillisten muutosten havaitsemiseen laboratorio-oloissa, ennen kuin laitteisto mahdollisesti viedään uudelleen maastokäyttöön. Työ on siten tavallaan jatkotutkimusta SALMELAN (1978) työlle. Testaus tehtiin kaloille tunnetusti myrkyllisil-

lä raskasmetalleilla, sinkillä ja kuparilla. Lisäksi verrattiin käytetyn menetelmän herkkyyttä automaattisessa biologisessa tarkkailussa paljon käytetyn parametrin, hengitysfrekvenssin mittaamisella tehtyihin havaintoihin. Kokeet tehtiin huhti-elokuussa 1978 Kyläsaaren kalalaboratoriossa.

Automaattinen biologinen tarkkailu on eräs sovellutus kaloilla tehtävistä toksisuustesteistä. Siitä on laajahko kirjallisuuskatsaus SALMELAN (1978) työssä. Tämän työn kirjallisuusosassa on näistä kirjallisuustiedoista tarkasteltu lyhyesti vain muutamia. Päähuomio on kiinnitetty kaloilla tehtäviä toksisuustestejä ja niiden päätyyppejä käsittelevään kirjallisuuteen.

2. KALOILLA TEHTÄVISTÄ TOKSISUUSTESTEISTÄ

2.1 KALA TOKSISUUSTESTIORGANISMINA

Kalojen on todettu olevan nisäkkäitä herkempiä monille myrkyllisille yhdisteille. Esimerkiksi Saksan Liittotasavallassa tehdyssä laajassa myrkkykokeessa tutkittiin lähes tuhannen erilaisen aineen myrkyllisyyttä kaloille ja nisäkkäille. Kalat havaitsivat noin 97 % tutkituista lämminverisille myrkyllisistä aineista (JUNG 1973).

Vedenlaatukriteerejä varten tehdyissä toksisuustesteissä on käytetty koeorganismina myös ravintoketjun alkupään organismeja. PATRICK ym. (1968) testasivat 18 eri kemikaalia kaloilla, etanoilla ja piilevillä ja havaitsivat herkkyyssjärjestyksen vaihtelevan. Tutkijat päätyivät suosittelemaan toksisuustestien tekemistä vähintään kolmella eri ravintoverkon osatekijällä.

Vertailtaessa kalojen ja selkärangattomien välisiä myrkkysten kestävyseroja ei ole havaittavissa mitään yksiselitteisyyttä: toiset aineet ovat myrkyllisempiä kaloille, toiset taas selkärangattomille. Myös eri selkärangattomien välillä voi olla suuria herkkyyseroja. ROTSCHEIN (1964) havaitsi hyönteismyrkkyjä tutkiessaan eri selkärangattomien välillä olevan jopa tuhatkertaisia eroja ja selkärangatto-

mien olevan jopa 7000 kertaa kaloja herkempiä.

2.11 K a l a l a j i n v a l i n t a

Toksisuustesteissä käytettävä kalalaji olisi valittava kokeen tarkoituksen mukaan. Jäteveden laatukriteerejä varten tehtävissä kokeissa tulisi käyttää jotakin purkuvesistön kalalajia. Useimmiten on kuitenkin turvauduttava helpommin saatavilla olevaan lajiin, jonka aikaisemmat elämänvaiheet (ikä, ravitsemustila, terveys ym.) tunnetaan.

Laboratoriokokeissa voidaan käyttää joko useita eri kalalajeja, paikallisesti tärkeintä tai jotakin toksisuustesteissä yleisesti käytettyä kalalajia. Nykyisin pyritään yhdenmukaistamaan toksisuustestijärjestelyjä, jotta tutkimustulokset olisivat vertailukelpoisia. Koeolojen yhdenmukaistamiseen kuuluu myös yhtenäisen koeorganismin, ns. standardilajin käyttö. Eri puolilla maailmaa kehitetään toksisuustestejä, joissa käytetään eri kalalajeja. APHAN ym. (1975) mukaan on erityyppisissä toksisuustesteissä käytetty viimeisten 50 vuoden aikana yli 60 kalalajia. Mikään laji ei kuitenkaan toistaiseksi ole osoittautunut kaikin puolin tyydyttäväksi: eri lajit ovat eri tavoin herkkiä erilaisille myrkyille. Kalalajin valinta riippuu myös mitattavasta suureesta ja mittausten menetelmästä. Seuraavassa mainittuja kalalajeja on käytetty paljon toksisuustestiorganismeina (SPRAGUE 1973).

Kirjolohi (Salmo gairdneri Richardson) on maailmanlaajuisesti käytetty viileän veden lohikala, jota on saatavissa ympäri vuoden kalanviljelylaitoksilta. Yhdysvalloissa käytetään paljon luonnonvesissä tavattavia Pimephales promelas Rafinesque - ja Lepomis macrochirus -lajeja. Trooppiset akvaariokalat ovat helpon saatavuutensa, hoidettavuutensa ja lisääntyvyytensä ansiosta suosittuja koeorganismeja. Yleisesti käytettyjä lajeja ovat mm. kultakala (Carassius auratus L.) ja miljoonakala (Poecilia reticulata Peters), joiden tosin on havaittu kestävän veden laadun muutoksia normaalia paremmin. Myös Floridan hammaiskarppi (Jordanella floridae Goode ja Bean) on suosittu koeorganismi.

Kansainvälinen Standardisoimisliitto on alustavassa ehdotuksessaan akuuttien toksisuus-testien (LC50-testit) yhdenmukaistamiseksi esittänyt seeprakalan (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan) ottamista standardikalaksi (ISO 1978). LAALE (1977) on koonnut lukuisia tutkimustuloksia, jotka käsittelevät seeprakalan soveltuvuutta toksisuustestiorganismiksi.

Tutkijoiden käsitykset standardikalan käytön mielekkyydestä poikkeavat toisistaan. BROWN (1976) on sitä mieltä, että ainoat toksisuustesteissä hyväksyttävät standardit ovat hyvä koetekniikka ja tieteellinen asiantuntemus. Mitä standardoidumpi testi tai koeorganismi on, sitä huonommin tulokset ovat sovellettavissa esim. veden laadun tarkkailuun. SPRAGUE (1973) taas puoltaa standardikalan käyttöä, koska standardikalalla tehtyjen kokeiden tulokset ovat usein toistettavissa myös muilla kalalajeilla. Standardikalan käytön hyväksyttävyys toksisuustesteissä riippunee kokeiden luonteesta ja tarkoituksesta: esim. erilaisten myrkyllisten aineiden vertailu on mahdotonta, jos koejärjestelyt ovat erilaiset.

Usein kalalajien väliset myrkynekestävyyserot ovat odotettua pienempiä. BALL (1967 a) tutki ammoniakkin akuuttia myrkyllisyyttä kirjolohelle (S. gairdneri) ja eräille luonnonvesien kaloille. Eri lajit olivat likimain yhtä herkkiä, kun koeaika oli yli kaksi vuorokautta. Suurille pitoisuuksille ja lyhyempänä koeaikana kirjolohi oli herkin. BALL (1967 b) tutki samoilla kalalajeilla sinkin myrkyllisyyttä ja havaitsi sinkin olevan kirjolohelle myrkyllisempää kuin luonnonvesien kaloille sekä lyhyenä että pitkänä koeaikana. Yleinen oletus onkin, että lohikalat ovat muita kaloja herkempiä useille myrkyllisille aineille. SOLBEN ja COOPERIN (1976) kokeissa kirjolohi oli kiivennuoliaista (Noemacheilus barbatulus L.) herkempi kadmiumille mutta kestävämpi sinkille.

Suurimmat havaitut myrkynekestävyyserot eri kalalajien välillä ovat raskasmetalleille olleet vain 10 - 100 -kertaisia, mikä on samaa suuruusluokkaa kuin erityyppisissä vesissä samalla kalalajilla saatujen tulosten vaihtelu (BROWN 1968).

2.12 K a l a n m y r k y n s i e t o o n v a i k u t t a - v i a t e k i j ö i t ä

Kalalajin sisäiset myrkynekestävyyserot johtuvat paitsi kalakannasta myös monista yksilöllisistä tekijöistä, joista mainittakoon kalan ikä, koko, ravitsemus- ja terveydentila sekä sukupuoli. Näiden tekijöiden vaikutukset tunnetaan vielä huonosti.

FALK ja DUNSON (1977) tutkivat happamuuden vaikutusta puronieriään (Salvelinus fontinalis L.) ja havaitsivat suuria eroja kalakantojen välillä. Vuodenaika vaikutti kalojen happamuuden sietoon siten, että helmikuussa pyydettyt kalat olivat herkempiä kuin joulukuussa pyydettyt. ROBINSON ym. (1976) havaitsivat, että puronieriään happamuudenkestävyys oli suurempi kesällä kuin muina vuodenaikoina. Vuodenaikojen merkitystä kalojen myrkkyjen sietoon ei ole vielä tarkoin selvitetty, mutta eri vuodenaikoihin liittyvä kalojen erilainen ravitsemustila lienee merkittävä tekijä.

Yleensä kalojen nuoret kehitysasteet ovat herkempiä myrkyille kuin aikuiset kalat. Mätijyvien on todettu olevan kestävämpiä kuin nuoret poikaset (WALDICHUK 1974).

Myöskään kalan koon merkitystä myrkynekestävyyteen ei ole perusteellisesti selvitetty. Yleensä nuoren kalan koko on suoraan verrannollinen ikään ja ravitsemustilaan, jotka vaikuttavat kalan herkkyyteen. Huono kunto heikentää kalan vastustuskykyä. HERBERT ja MERKENS (1952) havaitsivat pienikokoisten lohenpoikasten (Salmo salar L.) kestävänsä syanidia suurikokoisia poikasia paremmin. SOLBEN ja COOPERIN (1976) kokeissa taas suurikokoiset kivennuoliaiset (N. barbatulus) sietivät kuparia paremmin kuin pienikokoiset.

Kalan sukupuolen vaikutusta erilaisten räsitusten sietoon ei tarkasti tunneta. EATON (1974) ei havainnut herkkyyseroja sukupuolten välillä tutkiessaan kadmiumin haittavaikutuksia. Sen sijaan SPEHARIN (1976) mukaan koiraspuolisten kalojen kutukäyttäytyminen häiriintyi kadmiumin vaikutuksesta enemmän kuin naaraspuolisten.

Kalat voivat tulla resistenteiksi myrkyille joutuessaan altistetuiksi myrkyin subletaaleille pitoisuuksille. Mm. LLOYD (1960) tutki sin-

kin akuuttia myrkkyyvaikutusta ja havaitsi koekalojen kuolleisuuden pienentyneen, kun kaloja akklimatisoitiin subletaalissa sinkkipitoisuudessa ennen koetta parin viikon ajan. Etukäteisaltistuksen vaikutuksista subletaalien myrkkypitoisuuksien aiheuttamiin reaktioihin on suhteellisen vähän tietoa. SPRAGUE (1968) ei havainnut resistenttiyden kehittymistä tutkiessaan sinkin karkottavaa vaikutusta.

Jos kala on välillä puhtaassa vedessä, se kestää yleensä suurempia myrkkypitoisuuksia kuin ollessaan jatkuvasti myrkylle alttiina. Tämä selittyy myrkyn erittymisenä puhtaassa vedessä (SPRAGUE 1970). SOLBE ja COOPER (1976) havaitsivat koekalojen kidusten, silmien, lihasten ja selkänikamien kuparipitoisuuden pienenevän, kun kalat laitettiin kokeen jälkeen puhtaaseen veteen. Sen sijaan maksan kuparipitoisuus ei muuttunut.

2.2 KOEOLLOISTA

Eri tutkijoiden tekemien toksisuustestien tulokset poikkeavat huomattavastikin toisistaan, vaikka kokeissa olisi käytetty samaa kalalajia. Useimmiten erojen syynä on koejärjestelyjen erilaisuus. Vanhoissa toksisuustestejä käsittelevissä julkaisuissa ei ole ilmoitettu tarkkoja koejärjestelyjä, joten tulosten vertaaminen muihin tutkimustuloksiin on mahdotonta. Koejärjestelyjä pyritään nykyisin yhdenmukaistamaan, jotta tuloksia voitaisiin paremmin verrata keskenään (APHA ym. 1975, EIFAC 1975, ISO 1978).

Toksisuustestit voidaan tehdä staattisina, semistaattisina tai läpivirtausmenetelmällä (flow-through system). Yksinkertaisinta on tehdä kokeet staattisina, jolloin kalat ovat samassa vedessä koko kokeen kestoajan. Etenkin pitkäaikaisissa kokeissa koeveden laatu kuitenkin muuttuu: aineita voi saostua, haihtua, adsorboitua astian seinille, veteen joutuu kalan eritteitä ja ulosteita. SPRAGUE (1973) suositteliekin koeveden vaihtamista ajoittain eli kokeiden tekemistä semistaattisina. Läpivirtausmenetelmässä koevettä uudistetaan jatkuvasti. Tällöin aineiden pitoisuudet pysyvät vakioina eikä kala häiriinny veden vaihdosta kuten semistaattisissa kokeissa. Koeveden jatkuva vähittäinen uudistaminen vaatii tarkan, toimintavarman

myrkynannostelujärjestelmän, joka on yleensä kallis. Myös tutkittavia aineita ja laimennusvettä tarvitaan huomattavasti enemmän kuin staattisissa testeissä (SPRAGUE 1973).

Ehkä tärkein koejärjestelyissä huomioon otettava seikka on kokeissa käytettävän laimennusveden laatu. Subletaaleja myrkkyyvaikutuksia tutkittaessa myös ympäristön valaistus, meluisuus, värinä yms. voivat vaikuttaa tutkittaviin tekijöihin.

2.21 L a i m e n n u s v e s i

Laimennusveden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet vaikuttavat toksisuustesteissä käytettävien aineiden myrkyllisyyteen. Tärkeimmät kokeissa vaikuttavat tekijät ovat veden kovuus, happamuus, suolaisuus, happipitoisuus ja lämpötila (SPRAGUE 1970).

Veden kokonaiskovuus on hyvä erilaisia vesiä kuvaava suure, joka ilmentää usein myös monia muita veden ominaisuuksia. SPRAGUE (1973) luokittelee toksisuustestien kannalta pehmeäksi veden, jonka kovuus on korkeintaan $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$:a ja kovaksi veden, joka sisältää noin $200 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$:a. Veden suuri kovuus vaikuttaa antagonistisesti monien raskasmetallien myrkyllisyyteen (esim. LLOYD 1960).

Vetyionikonsentraatio vaikuttaa myrkkujen dissosioitumiseen ja siten esiintymismuotoon vedessä, mikä on tärkeä aineen myrkyllisyyteen vaikuttava tekijä. Esimerkiksi ammoniakkin myrkyllisyys riippuu ratkaisevasti veden happamuudesta (esim. BALL 1967 a).

Veden suolaisuus vaikuttaa aineiden myrkyllisyyteen aineesta riippuen joko myrkyllisyyttä lisäävästi tai vähentävästi. HERBERT ja WAKEFORD (1964) mainitsevat veden suolapitoisuuden kasvun lisänneen kalojen sinkinsietokykyä. BROWNin ym. (1967) mukaan fenolin myrkyllisyys kasvaa suolapitoisuuden kasvaessa.

Korkean lämpötilan oletetaan yleisesti lisäävän aineiden myrkyllisyyttä. On kuitenkin olemassa vastakkaisia, useimmiten pitkäaikaisista kokeista saatuja tuloksia: esim. BROWN ym. (1967) havaitsivat fenolin

myrkyllisyyden kasvavan lämpötilan aletessa. Korkea lämpötila nopeuttaa myrkyn absorboitumista, kun taas alhaisessa lämpötilassa myrkyn erittyminen ja detoksikaatio hidastuvat (SPRAGUE 1970).

Veden happipitoisuus liittyy kiinteästi veden lämpötilaan, sillä lämmin vesi kykenee liuottamaan happea vähemmän kuin kylmä. Jo veden riittävän alhainen happipitoisuus sinänsä aiheuttaa kalan kuoleamisen. Alhainen happipitoisuus voimistaa myrkkujen vaikutusta. LLOYD (1961 b) on esittänyt teorian, jonka mukaan aineen myrkyllisyyden kasvu happipitoisuuden aletessa on suora seuraus hengityksen kiihtymisestä, mikä suurentaa kidusten kautta vaikuttavaa myrkkymäärää.

Monet muutkin laimennusveden ominaisuudet voivat vaikuttaa toksisuustestien tuloksiin. Mm. orgaaniset yhdisteet, etenkin humushapot, sitovat raskasmetalleja inaktiiviseen muotoon vähentäen siten metallien myrkyllisyyttä. Myös fosfaattien on todettu vähentävän raskasmetallien myrkyllisyyttä (BRUNGS 1973).

Toksisuustesteissä voidaan käyttää laimennusvetenä tutkittavan vesistön vettä, kaivovettä, aktiivihiilisuodatettua johtovettä tai synteettistä laimennusvettä (SPRAGUE 1973).

Käytettäessä vesistöstä otettua pintavettä voidaan parhaiten soveltaa tuloksia käytäntöön. Pintaveden laatu kuitenkin vaihtelee mm. vuodenaikojen mukaan. Useimmiten laboratoriokokeissa käytetään helposti saatavilla olevaa kaivo- tai johtovettä. Kaivovesi (pohjavesi) on yleensä tasalaatuista, mutta voi sisältää suuria määriä esim. rauta- ja rikkiyhdisteitä. Aktiivihiilisuodatetussa johtovedessä voi olla vielä johtoveden desinfioimisessa käytettävää klooria, jonka on todettu olevan kaloille myrkyllistä jopa analyysitarkkuutta pienempinä pitoisuuksina (BRUNGS 1973). Synteettisiä laimennusvesiä on kehitetty erikseen kovalle ja pehmeille sekä makeille ja suolaisille vesille. Laimennusvettä valmistettaessa on kiinnitettävä huomiota veden oikeaan fysiologiseen koostumukseen - esim. kaliumin ja natriumin puute vaikuttaa haitallisesti kalojen aineenvaihduntaan (BROWN 1976).

2.22 Y m p ä r i s t ö

Toksisuustesteissä, joissa tutkitaan myrkkyjen subletaaleja vaikutuksia, esimerkiksi kalan hengitysfrekvenssin, aktiivisuuden ja yleensä käyttäytymisen muuttumista, ympäristötekijät voivat vaikuttaa koetuloksiin.

HEATHin (1972) mukaan ihmisten liikehdintä voi vaikuttaa koekalan hengitysfrekvenssiin ja -syvyyteen: kala saattaa säikähdettyään pidättää hengitystä ja sen jälkeen ruveta hengittämään normaalia kiivaammin. Hengitys tasaantuu vähitellen. Säikähtäminen saattaa aiheuttaa myös levottomuutta, joka ilmenee aktiivisuuden suurenemisena.

Valaistus on tärkeä tekijä etenkin kokeissa, joissa seurataan kalojen aktiivisuutta. Kalan aktiivisuus vaihtelee vuorokaudenaikojen mukaan. Tämä vaihtelu on ilmeisesti osittain endogeenista eikä siten ole välttämättä valaistuksesta riippuvaista. Yleensä kalojen on todettu olevan aktiivisimpia aamu- ja iltahämärässä. Myös kalojen hengitysfrekvensseissä on havaittu suuria eroja pimeänä ja valoisaan vuorokauden aikana (MORGAN JA KÜHN 1974). Valaistuksen äkillinen muuttuminen, esimerkiksi koehuoneen valojen sammuminen ja syttyminen, saattaa aiheuttaa kaloissa levottomuutta (esim. MEFFERT 1968, 1971, REYNOLDS 1977).

2.3 MYRKKYVAIKUTUKSISTA

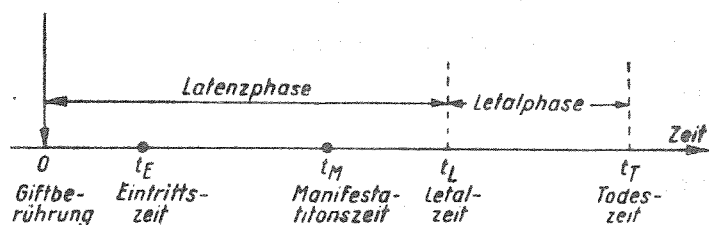
Myrkkyvaikutukset voidaan luokitella monin tavoin, joista ehkä yleisin on jako akuutteihin, subakuutteihin ja kroonisiin vaikutuksiin (LIEBMANN 1960). Akuutissa myrkytyksessä altistusaika on lyhyt, myrkky vaikuttaa nopeasti ja seurauksena on kuolema, jollei eliö pysty pakenemaan myrkyttömään ympäristöön. Akuutin myrkytyksen oireet ilmenevät yleensä neljän vuorokauden kuluessa. Subakuutissa myrkytyksessä oireet ovat havaittavissa vasta useiden päivien, jopa viikkojen kuluttua altistuksen alkamisesta. Kroonisessa myrkytyksessä altistusaika on pitkä, yleensä pitempi kuin kymmenesosa myrkylle alttiina olevan eliön elinajasta. Myrkytysoireet ilmenevät joko siksi, että myrkkyä akkumuloituu elimistöön, koska sen eliminoituminen

on hitaampaa kuin absorboituminen, tai siksi, että elimistö herkistyy toistuvien altistumisten myötä myrkylle, ilman että myrkkymäärä kudoksissa kasvaa.

Tietyn aineen myrkyllisyyteen vaikuttaa sekä aineen pitoisuus että sen esiintymismuoto. Muita myrkkyyvaikutuksen voimakkuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat koeorganismi, altistusaika, veden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet sekä ympäristöolot (SPRAGUE 1973).

2.31 Myrkkyyvaikutuksen yleinen kulukalalla

LIEBMANN (1960) esittää seuraavan kaaviokuvan myrkkyyvaikutuksen kuluista:



t_E = vaikutusten ilmenemisaika (Eintrittszeit)

t_M = manifestaatioaika (Manifestationszeit)

t_L = letaaliaika (Letalzeit)

t_T = kuolinaika (Todeszeit)

Kuva 1. Myrkkyyvaikutuksen kulku (LIEBMANN 1960).

Kun kala joutuu kosketukseen sellaisen myrkyllisen aineen kanssa, jonka se kykenee aistimaan, kala tulee usein levottomaksi ja yrittää paeta. Ns. alkulevottomuus kestää yleensä vain vähän aikaa, minkä

jälkeen saattaa seurata yli- tai aliärtyvyyttä: kala reagoi epänormaalien voimakkaasti tai laimeasti ympäristön muutoksiin. Tätä ensimmäisten myrkytysoireiden (= kalan normaalin käytöksen muuttuminen) ilmene-misaikaa kuvataan symbolilla t_E .

Manifestaatioaikana (t_M) myrkytysoireet pahenevat - tyypillisiä oireita ovat tasapainohäiriöt ja liikkeiden koordinoimisvaikeudet. Virtaavassa vedessä kala menettää kykynsä uida vastavirtaan. Manifestaatio-aika on toksisuustestien kannalta tärkein myrkytysvaihe: useimmissa subletaaleja myrkkyvaikutuksia tutkivissa kokeissa seurataan jotakin manifestaatioaikana muuttuvaa suuretta. Kun kala siirretään puhtaaseen veteen, myrkytysoireet katoavat vähitellen ja kala saattaa toipua täysin.

Letaaliaikana (t_L) kala kouristelee ja ponnistaa viimeiset voimansa kuolinkamppailuun. Kala ei enää toipuisi, vaikka pääsisi pois myrkyn vaikutuspiiristä. Letaaliaika jakaa myrkkyvaikutuksen kulun latenssi- ja letaaliveiheeseen sen perusteella, toipuisiko kala puhtaaseen veteen päästyään.

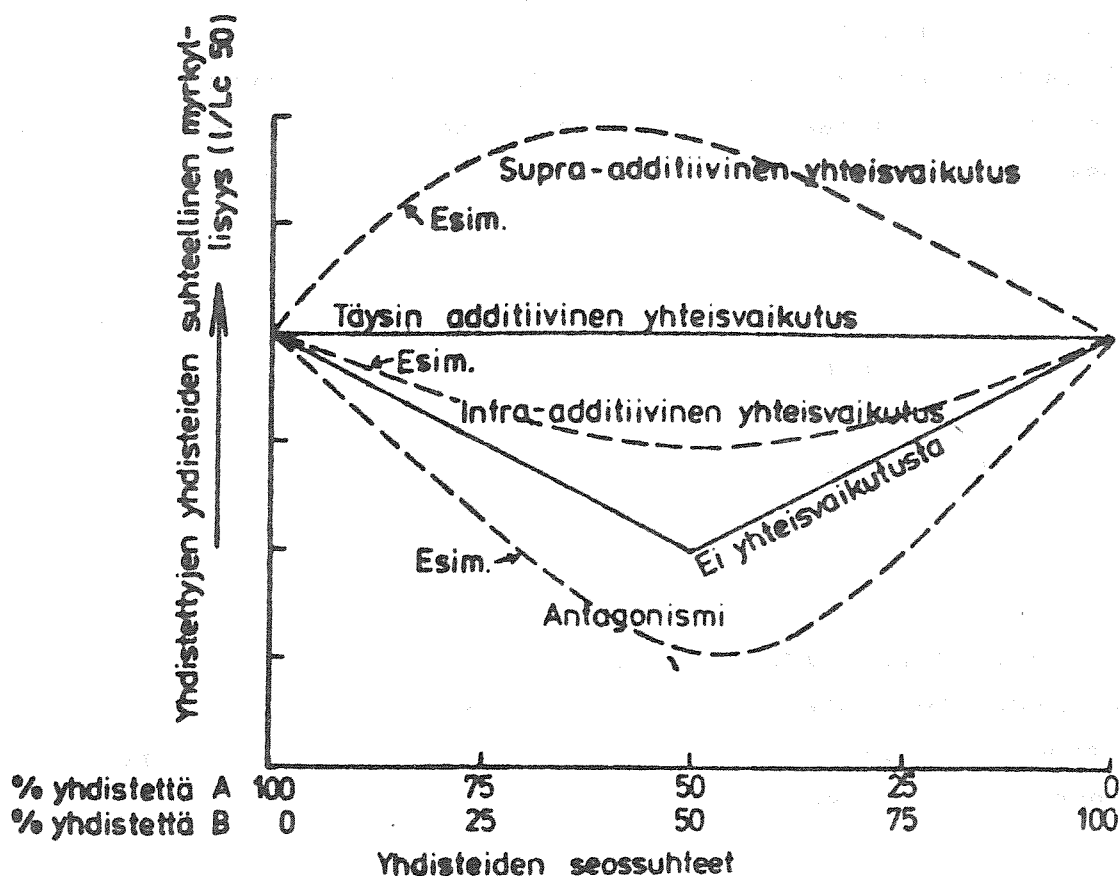
Myrkkyvaikutuksen kulun viimeinen vaihe on kalan kuolema. Yleensä kalan kuolinhetken määrittäminen on vaikeaa. Myrkkyvaikutuksen alkamisesta kalan kuolemiseen kuluva aika kuvataan symbolilla t_T .

Eri myrkytysvaiheiden pituudet ja myrkytysoireet vaihtelevat käytetyn myrkyn ja sen pitoisuuden mukaan. Etenkin manifestaatioaikana myrkytysoireet ovat usein spesifisiä, tietylle myrkylle tyypillisiä.

2.32 M y r k k y j e n y h t e i s v a i k u t u k s i s t a

Luonnossa myrkylliset aineet esiintyvät usein yhdessä ja saattavat vaikuttaa toistensa myrkyllisyyteen. Jos aineiden yhteismyrkyllisyys on sama kuin osamyrkyllisyyksien summa, kyseessä on additiivinen yhteisvaikutus. Jos seos on myrkyllisempi kuin komponenttien myrkyllisyyksien summa edellyttäisi, kyseessä on synergismi. Aine voi myös vähentää toisen aineen myrkyllisyyttä, jolloin puhutaan antagonistisesta yhteisvaikutuksesta. Terminologia on kuitenkin hieman sekavaa:

eri tutkijat määrittelevät termejä eri tavoin. Kuvassa 2 on synergistista yhteisvaikutusta nimitetty supra-additiiviseksi yhteisvaikutukseksi.



Kuva 2. Kahden yhdisteen mahdolliset yhteisvaikutukset (MIETTINEN 1975, WARRENin 1971 mukaan).

Myrkyllisten aineiden yhteismyrkyllisyyden arvioimiseksi on kehitetty suhteellisen yksinkertainen menetelmä, joka perustuu ns. myrkyllisyysyksiköiden summan määrittämiseen (BROWN 1968). Myr-

kyn voimakkuus ilmoitetaan liuoksen myrkkypitoisuuden ja myrkylle lasketun letaalipitoisuuden (esim. $LC50_{48h}$) osamääränä, jota kutsutaan myrkyllisyysyksiköksi. Kaikkien myrkkyjen myrkyllisyysyksiköt summaataan. Mikäli summa on suurempi tai yhtä suuri kuin yksi, myrkkyseos on kuolettavan myrkyllinen eli yli puolet koeorganismeista kuolee 48 tunnin kuluessa. Menetelmässä oletetaan kaikkien myrkkyjen vaikuttavan additiivisesti ja yhtä paljon kokonaismyrkyllisyyteen, mikä ei suinkaan pidä paikkaansa: myrkyt ovat vaikutusmekanismeiltaan erilaisia erilaisine pitoisuus-reaktio-käyrineen.

Menetelmää on kuitenkin käytetty menestyksekkäästi seoksille, jotka koostuvat 2-4 eri komponentista (esim. LLOYD 1961 a, HERBERT ja van DYKE 1964). Sen sijaan monimutkaisempien seosten kuten jätevesien myrkyllisyys usein aliarvioidaan. Hyvin pienten myrkkypitoisuuksien yhteismyrkyllisyys taas usein yliarvioidaan. Myös myrkkyjen reagoiminen keskenään heikentää menetelmän käyttökelpoisuutta (SPRAGUE 1970).

3. K A L O I L L A T E H T Ä V I E N T O K S I S U U S - T E S T I E N P Ä Ä T Y Y P P E J Ä

3.1 LETAALITESTIT

3.11 Y l e i s t ä

Helpoin ja ehkä yleisimmin käytetty jonkin yhdisteen tai jäteveden myrkkyvaikutuksen tutkimusmenetelmä on koeorganismien kuolleisuuden seuraaminen. Kuolleisuus on yleensä suoraan verrannollinen myrkyllisen aineen pitoisuuteen ja altistusajan pituuteen.

Letaalitesteissä pyritään saamaan selville tutkittavan aineen se pitoisuus tai altistusaika, joka aiheuttaa koeorganismeille tietyn kuolleisuuden. Yleensä käytetään kriteerinä 50 %:n kuolleisuutta, koska on havaittu, että koeorganismijoukon heikoimpien ja kestävimpien yksilöiden sisäiset kestävyysvaihtelut ovat suurempia kuin kestävyydeltään keskinkertaisten yksilöiden. Siten 50 %:n kuolleisuus on luotettavin ja parhaiten toistettavissa oleva letaalin toksisuuden mitta (SPRAGUE 1969). Kun tutkittavan aineen pitoisuus pidetään vakiona ja muutetaan altistusaikaa, määritetään aineen LT50-arvo (Lethal

Time to Death). LT50-symbolin synonyymeja ovat ET50 (Effective Time to Death) ja MST (Median Survival Time). Kun taas halutaan saada selville se pitoisuus, jossa puolet koeorganismeista kuolee tietyn koeajan kuluessa, määritetään tutkittavan aineen LC50-arvo (Median Lethal Concentration) (WALDEN 1976). LC50-symbolin rinnalla käytetään symbolia TL50 (Median Tolerance Limit). Eräissä tapauksissa TL50-symbolin käyttö on mielekkäämpää: esim. lämpötilaa ei voida ilmoittaa pitoisuuksina.

3.12 LC50- t e s t i t

Yleisin tapa tutkia jonkin aineen akuuttia myrkyllisyyttä on aineen LC50-arvon määrittäminen laboratoriokeuin. Jos altistusaika on pitkä, voidaan puhua aineen subakuutin tai kroonisen myrkyllisyyden mittaamisesta. LC50-kokeiden tulokset kertovat vain sen myrkkypitoisuuden, joka on kuolettava 50 %:lle koe-eläimistä tietyssä aikana tietyssä vedessä tietyissä koeoloissa eivätkä missään tapauksessa ole riittävä peruste esim. jäteveden komponenttien enimmäispitoisuusnormien laatimiseen.

LC50-arvon määrittämiseksi tehdään myrkkylaimennussarja ja havainnoidaan kalojen kuolleisuutta. Enemmän informaatiota saadaan rekisteröimällä kuolleisuus lyhyin väliajoin, mutta yksinkertais-
tetussa standardimenetelmässä (APHA ym. 1975) kuolleisuus havainnoidaan vain yhden, kahden ja neljän vuorokauden kuluttua altistuksen alkamisesta. Tulokset vaihtelevat altistusajan pituuden mukaan (esim. BALL 1967 a ja b). LC50-arvon yhteydessä on aina ilmoitettava koeaika (esim. LC50_{24h}, LC50_{96h}), koe-eläin sekä kuvailtava koeolot mahdollisimman tarkasti.

SPRAGUE (1969) on koonnut tutkimustuloksia vertaillakseen erilais-
ten aineiden myrkyllisyyden ilmenemiseen kuluvia aikoja. Yli puolessa 375:stä tapauksesta 50 %:n kuolleisuus saavutettiin neljän vuorokauden kuluessa. Vain kymmenesosa tapauksista vaati viikon tai sitä pitemmän koeajan ennen kuin puolet koekaloista kuoli. Monet vaaralliset myrkyt kuten PCB (polyklooratut bifenyylit), DDT (diklooridifenyyli-
trikloorietaani) sekä useat raskasmetallit ovat

kumuloituvia ja hitaasti vaikuttavia eikä LC50-testi sovellu niiden myrkyllisyyden arvioimiseen.

Eri tutkijoiden jollekin aineelle kokeellisesti saamat LC50-arvot ovat hyvinkin erilaisia. Myös samassa laboratoriossa samalla menetelmällä tehtyjen LC50-kokeiden tulokset voivat vaihdella jopa 20-80 %, joten menetelmän toistettavuus on melko huono (BROWN 1976). Samalla kalakannalla samassa laboratoriossa samoissa koeoloissa tehtyjen kokeiden tulokset voivat vaihdella eri vuodenaikoina jopa 2,5-kertaisesti (BROWN 1968).

Koekalojen lukumäärä on tärkeä tuloksiin vaikuttava tekijä. Vähimmäismääränä pidetään yleensä kymmentä kalaa aineen tiettyä pitoisuutta kohden. JENSEN (1972) on tutkinut LC50-arvon keskiarvon keskivirheen riippuvuutta otoskoosta. Otoskoon kasvaessa aina kolmeen kymmeneen pieneni estimoidun LC50-arvon keskiarvon keskivirhe huomattavasti. Tutkija suosittelee koekalojen optimimääräksi 20 kalaa tutkittavan aineen tiettyä pitoisuutta kohti.

LC50-testit ovat käyttökelpoinen tapa vertailla eri aineiden myrkyllisyyttä edellyttäen, että saadaan kehitetyksi ns. standarditesti, jossa on vakioitu niin monta tekijää kuin mahdollista: kalalaji ja -kanta, laimennusvesi ja koejärjestelyt.

3.2 SUBLETAALITESTIT

LC50-testien tuloksia voidaan käyttää lähtökohtana subletaalitestien suunnittelussa. LC50-testit eivät anna tietoa myrkyn subletaaleista vaikutuksista, jotka luonnossa ovat akuutteja vaikutuksia yleisempiä ja merkittävämpiä: vaikka jätevedessä olisi kuolettavia myrkkypitoisuuksia, ne alenevat vastaanottavassa vesistössä yleensä nopeasti subletaalille tasolle. Saattaahan olla, että kokeessa hengissä säilyvät yksilöt eivät kasvaisi tai lisääntyisi ko. pitoisuudessa tai että aine vaikuttaisi kaloihin karkottavasti, mikäli kaloilla olisi pakenemismahdollisuus. Myrkyllisten aineiden subletaaleihin vaikutuksiin on alettu kiinnittää huomiota ja on kehitetty useita eri menetelmiä subletaalien haittavaikutusten mittaamiseksi.

Subletaalitesteissä pyritään määrittämään myrkyllisen aineen tai jäteveden aiheuttaman myrkyvaikutuksen luonne ja etsimään sitten ne pitoisuudet, joissa myrkyvaikutusta ei enää ole havaittavissa. Laboratoriokokein saadut aineiden biologisesti turvalliset pitoisuudet (safe concentrations) eivät kuitenkaan ole välttämättä kaloille haitattomia luonnossa, jossa kalat joutuvat alttiiksi myös luonnollisille stressitekijöille kuten lämpötilan, suolaisuuden ja happipitoisuuden vaihteluille.

Jätevesien sisältämille myrkyllisille aineille asetetut enimmäispitoisuusnormit perustuvat useimmiten laboratoriossa tehtyjen kokeiden tuloksiin, sillä kenttäkokeet ovat laboratoriokokeita monimutkaisempia ja vaivalloisempia. Laboratoriokokein saaduissa kaloille haitattomissa, biologisesti turvallisissa pitoisuuksissa kalojen olisi pysyttävä hengissä, kasvettava, lisääntyttävä ja voitava muutenkin kaikin puolin hyvin (TARZWELL 1962). Vedenlaatukriteerien määrittämistä varten tehtävien toksisuustestien standardoiminen ei ole mielekästä, sillä kokeissa on otettava aina huomioon paikalliset olot. Yleiset suuntaviivat testien suorittamiseksi ovat kuitenkin tarpeellisia.

Aineen haitattoman pitoisuuden ja LC50-arvon perusteella voidaan laskea ns. soveltamistekijä (application factor): haitaton pitoisuus jaetaan tietylle kalalle tietyissä oloissa akuutisti myrkyllisellä pitoisuudella. Soveltamistekijää käytetään ennustettaessa saman aineen myrkyllisyyttä eri kalalajeille ja erilaisille vesille: ko. oloissa ko. kalalle laskettu LC50-arvo kerrotaan soveltamistekijällä, jolloin saadaan aineen teoreettinen haitaton pitoisuus (EATON 1975). Menetelmä on todettu käyttökelpoiseksi (esim. MOUNT 1968, MOUNT ja STEPHAN 1969). SPRAGUEn (1969) mukaan USA:ssa on useita vuosia käytetty yleisenä turvallisten pitoisuuksien ohjearvona kymmenesosaa 48 tunnin LC50-arvosta eli soveltamistekijänä 0,1:tä. Eri tutkijoiden kokeellisesti saamat soveltamistekijät ovat vaihdelleet 0,1 - 0,002 (EATON 1975). Alhaisimmat arvot on saatu kumuloituvilla myrkyillä tehdyissä kokeissa.

Myrkyllisten yhdisteiden aiheuttamat muutokset kaloissa eivät välttämättä ole haitallisia tai niiden haitallisuuden osoittaminen voi ol-

la vaikeaa. Etenkin tietyn myrkkyvaikutuksen ekologisen merkityksen osoittaminen on usein ylivoimaista. MOUNT ja STEPHAN (1967) luettelevat muutamia esimerkkejä: 10 %:n vähennys kalan veren hematokriittiarvossa on tuskin riittävä todiste myrkyn haitallisesta vaikutuksesta kalapopulaatioon. Kasvun väheneminen 30 vuorokautta kestävässä kokeessa voi olla ohimenevää ja siten merkityksentöntä pitemmän ajan kuluessa. Kalan käyttäytymismuutokset ilmentävät herkästi myrkkyvaikutuksia laboratorio-oloissa, mutta onkin jo vaikeampaa osoittaa, mitä merkitystä näillä käyttäytymishäiriöillä on luonnossa esimerkiksi kalakannan säilymisen kannalta.

3.21 Käyttäytymisen seuraamiseen perustuvat testit

3.211 Aktiivisuus

Myrkyn vaikutus kalan käyttäytymiseen havaitaan usein normaalin liikehännän muuttumisena. Kala saattaa tulla levottomaksi ja hyperaktiiviseksi tai päinvastaisessa tapauksessa normaalia rauhallisemmaksi, hypoaktiiviseksi. Liikehännän muuttuminen voi olla osoitus fysiologisesta rasituksesta, joka saattaa johtaa esimerkiksi kalan kasvun hidastumiseen, lisääntymiskyvyn heikkenemiseen ja jopa kuolemaan (esim. SHIRER ym. 1968, WALLER ja CAIRNS 1972, BENGTSSON 1974).

Usein kalat tulevat levottomiksi heti havaittuaan myrkyn. Laboratorikokeissa kalat kiertävät koeastiaa ja yrittävät paeta epämiellyttäväksi käyneestä ympäristöstä. Myrkystä ja sen pitoisuudesta riippuen alkulevottomuus voi joko jatkua, tyyntyä normaaliksi tai muuttua täydelliseksi hiljaisuudeksi ja paikallaan pysymiseksi. Hypoaktiivisuus voi kestää kalan kuolemiseen saakka, mutta yleensä hengen menetystä edeltää kuolinkamppailu. Hyvä esimerkki hyperaktiivisuutta seuraavasta hypoaktiivisuudesta ovat BENGTSSONin (1974) tekemät sinkkikokeet. Yliaktiivisuus voi olla kalalle edullista luonnonoloissa, jolloin kalan pakenemismahdollisuudet kenties lisääntyvät. Toisaalta normaalista liikkumismallista poikkeaminen saattaa tehdä kalan alttiimmaksi petojen saalistukselle.

Yksinkertaisin tapa havainnoida kalan liikkeitä on visuaalinen tarkkailu, joka ei vaadi erityisiä laitteita. Ympäri vuorokautinen liikkeiden seuraaminen on luonnollisesti työlästä, ja ihmisen läsnäolo voi aiheuttaa kalan normaalista poikkeavaa liikehdintää.

Useimmat kalan liikkeiden tarkkailumenetelmät toimivat valosähköisellä periaatteella. Valon lähteenä voidaan käyttää esimerkiksi linssilamppuja, valon säteen vastaanottajina valovastuksia tai valotransistoreja. Kala aiheuttaa valon säteen eteen joutuessaan säteen katkeamisen, mikä synnyttää vastuksen tai transistorin välityksellä sähköisen impulssin. Impulssi rekisteröidään esimerkiksi laskimelle tai piirturille. Sopivasti rakennetuilla lamppu- ja transistori- tai kennomatriiseilla voidaan rekisteröidä kaikki kalan liikkeet ja paikanvaihdokset ja siten määrittää kalan normaali liikkumismalli, johon erilaisten myrkkujen vaikutuksen alaisena olevan kalan liikkumismalleja verrataan (esim. KLEEREKOPER 1977).

Kalojen liikehdintää voidaan seurata käyttämällä apuna ultraääntä (CUMMINGS 1963, MUIR ym. 1965, MEFFERT 1968, 1971). Kalan liikkuminen tiettyyn referenssipisteeseen nähden muuttaa ultraäänilähetimestä vastaanottoon tulevan äänen taajuutta, mikä rekisteröityy esimerkiksi piirturille. Ultraäänilähetin ja -vastaotin sijaitsevat koeastian ulkopuolella eivätkä siten vaikuta kalan liikehdintään. Ultraäänen taajuus (20 000 Hz) on suurempi kuin kala kykenee aistimaan - kalojen kuulon yläraja on 7000 Hz (KOLI 1973), joten ultraääni ei vaikuta kalojen käyttäytymiseen.

Kalan liikkeitä voidaan seurata myös kalaan kiinnitettävällä pienellä ääniaaltolähettimellä (KANWISHER ym. 1974).

3.212 Uintikyky

Myrkkujen vaikutusta kalan uintikykyyn ja -nopeuteen on tutkittu suhteellisen vähän. Uintikyvyn heikkeneminen on melko myöhäinen myrkytysoire eikä ilmennä kovin herkästi myrkkujen vaikutuksia. LEMKE ja MOUNT (1963) eivät havainneet erään detergentin suurienkaan pitoisuuksien vaikuttaneen uintikykyyn. Sen sijaan Mac LEODin ja

SMITHin (1966) tekemissä kokeissa metsäteollisuuden jäteveden kuitu heikensi koekalojen uintikykyä. Syynä uintikyvyn heikkenemiseen oli aktiivisen hapenoton väheneminen, jolloin myös lihasten hapen saanti heikkeni.

LINDAHL ym. (1977) ovat tutkineet kalan kunnon heikkenemistä ns. rotatory-flow -tekniikalla. Kunnon osoittajana on kalan kyky vastustaa pyörivän vesivirran vääntövoimaa: mitä huonokuntoisempi kala on, sitä pienempi vaakatasossa olevan sylinterin muotoisen koeastian kierrosnopeus aiheuttaa kalan pyörimisen virran mukana. Vertaillaessaan likaantuneen ja luonnontilaisen vesistön kaloja tutkijat havaitsivat likaantuneen veden kalojen kestävän paljon pienempiä kierrosnopeuksia. Kalojen lihasten metyylielohopeapitoisuus ja sylinterin kriittinen kierrosnopeus korreloivat keskenään negatiivisesti.

Useat kalalajit - etenkin lohikalat - pysyttelevät virtaavassa vedessä paikallaan uimalla aktiivisesti vastavirtaan eli ovat positiivisesti rheotaksisia. Kun kala joutuu alttiiksi myrkylliselle aineelle, se voi jossakin vaiheessa ajautua virran mukaan eli menettää positiivisen rheotaksisuutensa. ZAHNER (1962) käytti rheotaksisuuteen perustuvaa toksisuustestiä, jota ovat edelleen kehittäneet BESCH ym. (1972), BESCH ym. (1977) ja POELS (1975, 1977). ZAHNER (1962) suosittelee rheotaksisuustesteihin liitettäväksi visuaalisen tarkkailun - jotta kokeissa saataisiin luotettavia tuloksia, on tunnettava tarkoin koekalojen normaali käyttäytyminen ennen koetta.

3.213 Valintatestit

Kala aistii ympäristön muutoksia ja kykenee normaalisti muuttamaan olinpaikkaansa tarpeen mukaan: kun kala havaitsee myrkyn, se yleensä pyrkii hakeutumaan pois epämiellyttäväksi käyneestä ympäristöstä puhtaampaan veteen.

Kalojen orientoitumiskäyttäytymistä voidaan tutkia laboratoriossa ns. valintatestikammioilla (avoidance chamber). Valintatestikammiona voi toimia yksinkertainen putki, jonka toisesta päästä syötetään puhdasta, toisesta tutkittavaa ainetta sisältävää vettä. Vesi poistuu putken keskeltä. Enemmän informaatiota saadaan monihaaraisesta valinta-

kammiosta, jossa voidaan tutkia useampia aineita ja pitoisuuksia samanaikaisesti rekisteröimällä kalojen käyntitiheys ja oleskeluaika kussakin haarassa. Nykyään on siirrytty karttamis- ja hakeutumisreaktioiden (avoidance and attraction) visuaalisesta havainnoinnista valosähköiseen rekisteröintiin ja valokuvaukseen (esim. REYNOLDS 1977, KLEEREKOPER 1977).

Lukuisat laboratoriokokeet osoittavat, että kalat osaavat karttaa monia myrkyllisiä yhdisteitä. Erilaiset myrkyt aiheuttavat eriasteisia reaktioita eri pitoisuuksina. Raskasmetallit karkottavat kaloja huomattavasti voimakkaammin kuin useat herbisidit ja insektisidit. FOLMARin (1976) tekemässä kokeessa kirjolohi karttoi jo pitoisuutta $0,0001 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$. JONESin (1974) tekemissä kokeissa kalat karttoivat pieniä lyijypitoisuuksia, mutta hakeutuivat suuriin lyijypitoisuuksiin. Tällaista kalan hakeutumista epäedulliseen ympäristöön ovat havainneet myös SPRAGUE ja DRURY (1969), joiden tutkimuksessa kalat suosivat tiettyä letaalia klooripitoisuutta, mutta välttivät sitä pienempiä ja suurempia pitoisuuksia.

Lohikalojen vaellusreittien likaantumisella voi olla kohtalokkaita seurauksia lajin lisääntymiselle. SAUNDERS ja SPRAGUE (1967) tutkivat erään metallitehtaan jätevesien vaikutuksia Atlantin lohen (Salmo salar L.) vaellukseen. Tutkijat havaitsivat kalojen kääntyvän takaisin alavirtaan kesken normaalin kutuvaelluksen, kun joki-veden kupari- ja sinkkipitoisuudet suurenivat tietylle tasolle. Laboratoriokokeissa huomattavasti pienemmät sinkki- ja kuparipitoisuudet vaikuttivat Atlantin lohta karkottavasti (SPRAGUE 1971). Tämä huomattavasti suurempi myrkyt sielo luonnossa oli ilmeisesti seurausta vahvasta motivaatiosta, joka laboratoriokokeissa puuttui.

3.214 Testien käyttökelpoisuuden arviointia

Kalat käyttäytyvät toksisuustesteissä yksilöllisesti, mikä vaikeuttaa käyttäytymiseen perustuvien testien tulosten tulkintaa ja käytännön sovellutusten kehittämistä.

Kalan aktiivisuus vaihtelee luonnostaan kalan mielihalujen mukaan: aktiiviset ja passiiviset jaksot vuorottelevat ja jaksojen pituudet vaihtelevat. Normaalin liikkumismallin määrittämiseksi on seurattava kalaa useiden päivien ajan ja kala saattaa sittenkin käyttäytyä normaalista mallista poikkeavasti (KLEEREKOPER 1977).

Useat kalalajit pysyttelevät virtaavassa vedessä paikoillaan. Kalat saattavat mennä ajoittain jonkin matkaa virran mukana kenties vaihtelun halusta tai levähtämistarpeen vuoksi. Kalan kunnon huononeminen ilmenee uintikyvyn heikkenemisenä, mutta uintikyvyn menetys on vasta hyvin myöhäinen myrkytysoire (BESCH ym. 1977). Useimmiten uintikykynsä menettäneet kalat eivät enää toivu, vaikka ne siirrettäisiin puhtaaseen veteen (LIEBMANN 1960).

Valintatesteissä kalalla on kolme käyttäytymismahdollisuutta: se voi pysytellä puhtaassa vedessä, oleskella tutkittavaa ainetta sisältävässä vedessä tai uiskennellä edestakaisin puhtaasta liikkeeseen veteen. Kun kala ylittää jyrkän rajan puhtaan ja liikaisen veden välillä, se voi kääntyä takaisin pelkän äkillisen veden laadun muutoksen vuoksi - tutkittava aine ei ehkä vaikuttaisi karkottavasti, jos sen pitoisuus kasvaisi vähitellen kuten yleensä likaantuneessa joessa tai järvessä (DOUDOROFF 1977). Valintatesteissä saadut tulokset ovat vaikeasti siirrettävissä luontoon, jossa vaikuttavat monet laboratoriokokeista eliminoidut fysikaalis-kemialliset ja biologis-ekologiset tekijät.

3.22 Hengityksen mittaamiseen perustuvat testit

3.221 Hengitysfrekvenssi ja -syvyys

Monet ympäristötekijät kuten veden lämpötila ja happipitoisuus sekä fotoperiodi vaikuttavat kalan hengitysfrekvenssiin ja -syvyyteen. Myös useat kaloille haitalliset aineet aiheuttavat hengitysfrekvenssin ja/tai -syvyyden muuttumista.

Yksinkertaisin tapa mitata kalan hengitysfrekvenssi on tarkkailla visuaalisesti kalan suun ja kiduskansien liikkeitä ja laskea liikkeiden määrä minuuttia kohti. Samalla voidaan subjektiivisesti arvioida hengityksen syvyyttä. Laskijan liikehdintä voi kuitenkin vaikuttaa tuloksiin: kala voi säikähdettyään pidättää hengitystä ja sen jälkeen hengittää hetken normaalia kiivaammin (HEATH 1972).

Useat tutkijat ovat käyttäneet hengityksen mittaamisessa kalan sydämen läheisyyteen asetettua elektrodia (esim. SHELTON ja RANDALL 1962, MARVIN ja HEATH 1968). Kalassa olevan ja veteen laitetun inaktiivisen elektrodin välinen sähköinen jännite muuttuu kalan hengittäessä ja kalan sydämen lyödessä. Menetelmä rekisteröi siten sekä elektrokardiogrammin että hengitysfrekvenssin, muttei mittaa hengityksen syvyyttä. Kalaan kiinnitetty elektrodi irtoaa parissa päivässä ympäröivän kudoksen hajotessa, joten menetelmä soveltuu vain lyhytaikaisiin kokeisiin.

Kalojen hengitysliikkeitä voidaan seurata myös kalan ruumiin ulkopuolisten elektrodien avulla (esim. SPARKS ym. 1972). Koealtaan molempiin päihin asetetaan mieluiten ruostumattomasta teräksestä valmistetut elektrodit, joiden välinen jännite vaihtelee veden liikkeiden mukaan. Veden liikkumista aiheuttaa kalan hengittämisen ohella kalan liikehdintä, mikä häiritsee mittausta. Uintiliikkeiden tuottamat signaalit voidaan kuitenkin useimmiten erottaa tulostusvaiheessa hengityssignaaleista. HEATHin (1972) mukaan menetelmän suurin heikkous on se, ettei kyetä mittaamaan hengityksen syvyyttä. Kun kalan olinpaikka elektrodien suhteen muuttuu, jännitevaihteluiden amplitudi muuttuu, vaikka hengityksen syvyys pysyisi samana.

Hengitystilavuus, joka kuvaa hengityksen syvyyttä, voidaan mitata joko suoraan mittaamalla hengityksessä käytettävä vesimäärä (DAVIS ja CAMERON 1970) tai määrittämällä suu- ja kidusonteloiden veden hapen osapaine ja hapen kuluminen hengityksessä, jolloin voidaan laskea ns. Fickin periaatteeseen nojautuen hengitystilavuus (HUGHES ja SAUNDERS 1970). Hengitystilavuuden mittausjärjestelyt ovat kuitenkin hankalia ja menetelmä sisältää runsaasti virhelähteitä.

Kalan suu- ja kidusonteloiden laajeneminen ja supistuminen aiheuttaa painemuutoksia, jotka aikaansaavat veden virtauksen kidusten läpi. Nukutettujen kalojen suu- ja kidusonteloon voidaan sijoittaa painemittareihin yhdistetyt kanyylit. Paineenmuutoksia rekisteröimällä voidaan seurata paitsi hengitysfrekvenssiä myös hengityksen syvyyttä, jota painenvaihteluiden amplitudit kuvaavat melko hyvin (HUGHES ja ROBERTS 1970, HUGHES ja SAUNDERS 1970). Jotkut kalalajit - esimerkiksi lohi - reagoivat alhaiseen happipitoisuuden ensin syventämällä hengitystä; hengitys kiihtyy vasta myöhemmin happipitoisuuden edelleen pienetessä (MARVIN ja HEATH 1968, HUGHES ja SAUNDERS 1970). Tällöin pelkkä hengitysfrekvenssin mitaaminen ei paljastaisi veden laadussa tapahtuneita, kalalle haitallisia muutoksia.

O'HARA (1971) tutki resipiometrillä kuparin vaikutusta kalan hengityksessä kuluvaan happimäärään; kala oli asetettu astiaan, jonne tulevan ja josta lähtevän veden happipitoisuus mitattiin. Jo melko pienet kuparipitoisuudet aiheuttivat hapenkulutuksen kasvua. Hapenkulutuksen kasvua voivat kuitenkin aiheuttaa myös muut tekijät kuin myrkyn aiheuttama hengityksen kiihtyminen ja syveneminen.

3.222 Yskimisfrekvenssi (coughing frequency)

Kalan hengitysaktiivisuuden sähköinen rekisteröinti tulostetaan yleensä graafisesti. Sahanterää muistuttavassa kuvaajassa havaitaan frekvenssin ja/tai amplitudin pitempiaikaisen muuttumisen lisäksi yhtäkkisiä korkeita piikkejä, joita usein edeltää hengitystauko ja joiden jälkeen hengitysfrekvenssi voi olla normaalia suurempi. Englanninkielinen nimitys "coughing" kuvaa ilmiötä hyvin: kalat todellakin yskivät. Yskimällä kala yrittää ilmeisesti päästä eroon kidusten pinnalla olevista hengittämistä vaikeuttavista tekijöistä.

CARLSON ja DRUMMOND (1978) tutkivat kalan ruumiin ulkopuolisia elektrodeja käyttämällä erilaisten puhdistettujen jätevesien vaikutusta yskimisfrekvenssiin. Myrkyllisiksi tiedetyt jätevedet aiheuttivat asteittain tihenevää yskimistä, kun jätevesipitoisuus

suureni akuutisti myrkylliselle tasolle. Vastaavasti yskimisfrekvenssi pieneni jäteveden laadun parantuessa. Erilaiset jätevedet aiheuttivat eriasteisia yskimisfrekvenssin muutoksia.

HUGHESin ja ROBERTSsin (1970) sinkkikokeissa kalojen yskimisfrekvenssit kasvoivat 1150 % ennen kalojen kuolemista. Pienemmät yskimisfrekvenssien muutokset voivat ennakoida myrkyllisten aineiden subletaaleja vaikutuksia. McKIM ja BENOIT (1971) määrittivät koealalle biologisesti turvalliseksi kuparipitoisuudeksi $9,5 \mu\text{gl}^{-1}$. Kalan yskimisfrekvenssi kasvoi huomattavasti vasta $9,0 \mu\text{gl}^{-1}$ suuruisissa pitoisuuksissa.

3.223 Testien käyttökelpoisuuden arviointia

Myrkylliset aineet vaikuttavat kalaan usein kidusten kautta, jolloin kalan hengittäminen vaikeutuu. Hengitys voi kiihtyä tai syventyä, tai kala saattaa ruveta yskimään.

Kalan hengitysaktiivisuutta voidaan mitata monin eri menetelmin, joiden käyttökelpoisuutta HEATH (1972) on vertaillut. Tutkijan mielestä paras hengitysaktiivisuuden mittausmenetelmä on suu- ja kidusonteloiden paineen mittaaminen, jolloin voidaan samanaikaisesti seurata moniahengitykseen liittyviä muuttujia. Tosin menetelmän vaatima kanylointi on hankalaa eivätkä kanyylit kestä paikoillaan muutamia viikkoja pitempiä aikoja.

Teollisuusjätevesien laaduntarkkailuun on kalan ruumiin ulkopuolisia elektrodeja käyttävä menetelmä yksinkertaisuutensa vuoksi suositeltavin. Tällöin on koekalaksi valittava laji, joka reagoi myrkkyihin muuttamalla hengitysfrekvenssiä, sillä menetelmällä ei voida rekisteröidä hengityksen syvyyttä. Koekaloina voidaan käyttää pienikokoisia lajeja, joihin ei pystyittäisi kiinnittämään elektrodeja tai kanyyleja.

SELLERS ym. (1975) vertailivat erilaisten hengitykseen liittyvien suureiden - hengitysfrekvenssin ja -syvyyden, yskimisfrekvenssin sekä suu- ja kidusontelon paineen - muuttumista subletaalien sink-

ki- ja kuparipitoisuuksien vaikutuksesta. Tutkijat havaitsivat sinkin ja kuparin aiheuttavan muutoksia kaikissa neljässä suureessa, mutta yksikään mitatuista suureista ei ollut riittävän luotettava myrkyllisyyden kokonaiskuvan hahmottamiseksi. Esimerkiksi tietty veden kuparipitoisuus voi aiheuttaa hengitysfrekvenssin suurenemista ja -syvyyden pienenemistä kun taas yhtä suuren sinkkipitoisuuden tai jonkin toisen kuparipitoisuuden vaikutus voi olla päinvastainen. Parhaiten metallien eri pitoisuuksien myrkyllisyyttä ilmensi yskimisfrekvenssi: kalat reagoivat suureneviin sinkkipitoisuuksiin tihentämällä yskimistä sitä enemmän mitä suurempi veden sinkkipitoisuus oli. Vastaavaa kvantitatiivista suhdetta yskimisfrekvenssin ja kuparipitoisuuden välillä ei kuitenkaan havaittu.

CARLSON ja DRUMMOND (1978) toteavat tutkimuksensa lopuksi, että kalan yskimisreaktion mittaaminen on erittäin käyttökelpoinen tapa valvoa käsitellyn jäteveden laatua. Yskimisfrekvenssin mittaamisessa käytettävät elektrodikammiot ovat yksinkertaisia ja helppoja rakentaa eikä tietojen rekisteröintikään ole monimutkaista. Kalan liikehdinnän aiheuttamat häiriöt ovat vähäisempiä kuin hengitysfrekvenssiä mitattaessa. Käytännön kannalta on tärkeää kalan reagoimiseen kuluva aika: yskeminen tihenee usein ennen hengitysfrekvenssin suurenemista.

3.23 K a s v u

Kalan kasvunopeus kuvaa melko hyvin kalan viihtymistä tietyssä ympäristössä. Monet myrkylliset yhdisteet häiritsevät kalan aineenvaihduntaa ja heikentävät siten kasvua. Toisaalta kalojen elintoinnatt vaativat useita erilaisia aineita. Esimerkiksi PICKERINGin (1968) kokeissa pienet sinkkipitoisuudet nopeuttivat kalojen kasvua.

Kasvunopeuden mittaaminen on helppoa eikä vaadi välttämättä pitkiä koeaikoja. WARRENin ja DAVISin (1967) mukaan kaksi viikkoa on useimmiten riittävän pitkä laboratoriokokeiden kesto aika - pitempiaikaisissa kokeissa kasvunopeutta voisivat muuttaa muut kuin tutkittavat tekijät, kuten esimerkiksi vuodenaika ja kalan koon muuttuminen.

Yksinkertaisin tapa mitata kalan kasvunopeutta on kalan punnitseminen tietyin väliajoin. Kalan bruttopainon lisäystä herkempi kasvunopeuden mitta on kuitenkin WARRENin ja DAVISin (1967) mukaan kalan ravinnon käytön tehokkuus, jonka mittaaminen on tosin painon lisäyksen mittaamista monimutkaisempaa.

3.24 Infektioalttiutus

Infektion puhkeamiseen kalalla vaikuttaa kalan vastustuskyky, taudinaiheuttajan määrä ja virulenssi sekä ympäristötekijät. Myrkyt vaikuttavat ympäristön laatuun ja aiheuttivat kalan elintoiminnoissa muutoksia, jotka lisäävät infektiotalttiutta - mm. ihoinfektion puhkeamista edesauttaa ihon mekaaninen tai kemiallinen vaurioituminen.

Haitallisten aineiden vaikutuksia kalojen infektiotalttiuteen on tutkittu hyvin vähän ja useimmiten laboratoriokeuin. HERBERT ja MERKENS (1961) havaitsivat veden subletaalin kiintoainepitoisuuden edesauttavan evämädän puhkeamista. Tutkijoiden mukaan kiintoaineen vaikutus taudin puhkeamiseen oli epäsuora: epäedullinen muutos veden laadussa lisäsi ratkaisevasti ympäristöolojen kaloille aiheuttamaa stressiä, jonka kontrollikalat vielä kykenivät sairastumatta kestämään.

Luonnonoloissa on hyvin vaikeaa todistaa jonkin myrkyllisen yhdisteen tai jäteveden vaikuttaneen kalataudin puhkeamiseen, etenkin jollei kyseistä vesistöä ja sen kalastoa tutkita jatkuvasti. Yksi harvoista selvistä tapauksista oli eräs jatkuvan kalastustutkimuksen kohteena oleva järvi, jossa katsottiin veden korkean lämpötilan ja vesistöön lasketun, sinkkiä ja kuparia sisältävän jäteveden yhdessä ratkaisevasti edesauttaneen vakavan Aeromonas liquefaciens-infektion puhkeamista (PIPPY ja HARE 1969).

3.25 Kertyvyystestit

Joillekin aineille - mm. useille raskasmetalleille, DDT:lle ja PCB:lle - on tyypillistä kertyminen eli kumuloituminen eliöihin,

pitkä puoliintumisaika ja rikastuminen ravintoketjuissa. Vaikka organismiin kertynyt myrkkymäärä olisi itse organismille vaaraton, saattaa aineen suhteellinen pitoisuus kasvaa vaaralliseksi ravintoketjujen ylemmissä osissa.

Veden myrkkypitoisuudesta ei voida päätellä kalan myrkkypitoisuutta - etenkin kumuloituvien myrkkujen pitoisuudet kaloissa voivat olla moninkertaisia veden myrkkypitoisuuksiin verrattuna. Lisäksi pitkäaikaisissa myrkkykokeissa tapahtuu detoksikaatioita, jonka suuruutta ja merkitystä ei vielä tunneta (BROWN 1976).

Lyhytaikaisin toksisuustestein ei voida tutkia kumuloituvien myrkkujen vaikutuksia, sillä tulokset ilmenevät vasta pitkän altistustajan kuluttua. Kumuloituvien myrkkujen tutkimisessa on olennainen osa kalan eri elimien ja kudosten myrkkypitoisuuksien määrittäminen. Vesiorganismien sisältämien kumuloituvien myrkkujen pitoisuusmäärittäyksiä on tehty paljon, mutta SPRAGUEN (1976) mielestä on kiinnitetty aivan liian vähän huomiota kemiallisten analyysitulosten tulkitsemiseen: olisi selvitettävä, millaisia biologisia vaikutuksia eri myrkkypitoisuudet kuvastavat.

Myös muiden kuin kumuloituvien myrkkujen vaikutusten tutkimisessa voidaan käyttää apuna kalan myrkkypitoisuuden määrittämistä. Eri elinten myrkkypitoisuuksien määrittämisellä saadaan tietoa myrkkujen kulkeutumisesta ja kerääntymisestä elimistössä.

3.26 L i s ä ä n t y m i s h ä i r i ö t

Vesien pilaantuminen voi häiritä kalojen lisääntymistä monella tavalla. Pohjalle laskeutuneen kiintoaineen aiheuttama kutupaikkojen tuhoutuminen on Suomessa yleistä metsäteollisuuden liikaamissa vesistöjen osissa (esim. SEPPOVAARA 1977). Jätevesien sisältämät kaloille haitalliset yhdisteet voivat muuttaa kalojen kutukäyttäytymistä ja estää kudun onnistumisen (esim. MOUNT 1968). CRANDALL ja GOODNIGHT (1962) havaitsivat useiden myrkyllisten aineiden viivästyttävän kalan sukukypsyyttä. Myrkyt voivat estää tai vähentää kalan mädintuotantoa, mädin hedelmöittymistä, häiri-

tä hedelmöittyneen mädin kehittymistä, poikasten kuoriutumista ja kehittymistä aikuisiksi - näistä kaikista myrkkujen vaikutuksista on olemassa runsaasti tutkimuksia, joista SPRAGUE (1971) on esittänyt yhteenvedon.

Yleensä jonkin aineen kroonista myrkyllisyyttä tutkitaan seuraamalla myrkyn vaikutuksia koekaloihin yhden sukupolven ajan. MOUNT ja STEPHAN (1967) suosittelivat kokeen aloittamista mädillä tai 20 päivää nuoremmilla poikasilla ja kokeen jatkamista, kunnes näiden jälkeläiset ovat vähintään 30 päivän ikäisiä.

Kalan mädin ei ole todettu olevan erityisen herkkää myrkyllisille yhdisteille (SPRAGUE 1971). SAUTERin ym. (1976) tutkimuksissa raskasmetallit heikensivät poikasten eloonjäämistä ja kasvua pitoisuusina, jotka eivät häirinneet mädin kehittymistä.

Parhaiten laboratoriossa tehtäviin lisääntymiskokeisiin soveltuvat luonnollisesti kalalajit, jotka saavuttavat sukykypsyyden nopeasti. Akvaarioissa viljeltävillä, tropiikista kotoisin olevilla pienikokoisilla kaloilla voidaan yhden sukupolven ajan kestävä koe saattaa loppuun 2-3 kuukaudessa (SPRAGUE 1976).

3.27 Muutokset kudoksissa ja veriarvoissa

Subletaalien myrkyvaikutusten ennustaminen perustuu myrkkujen fysiologisten vaikutusmekanismien tuntemiseen, mikä puolestaan edellyttää perehtymistä mm. histopatologiaan, hematologiaan ja biokemiaan.

Toksisuustesteissä voidaan seurata eri kudoksissa tapahtuvia muutoksia tarkastelemalla värjättyjä histologisia leikkeitä mikroskooppisesti. Etenkin kidukset ovat suosittu histopatologisen tutkimuksen kohde. Kalan verestä voidaan mitata useita suureita, joihin myrkyllisten yhdisteiden on todettu vaikuttavan. Yleisimmin tutkitaan hematokriittia ja hemoglobiinia, jotka kuvaavat veren hapenkuljetuskykyä. Nykyisin tutkimuksen kohteena ovat mm. veri-

solujen lukumäärä, veren proteiini-, sokeri- ja maitohappopitoisuus, entsyymiaktiivisuus ja ionikoostumus sekä lihasten ja maksan glykogeenipitoisuus (Ruoppa, M. suull. tied.).

Toistaiseksi kudossrakenteen ja veriarvojen muutosten käyttö myrkyvaikutusten osoittajana on kehittelyasteella. Jotta muutokset voitaisiin havaita, on oltava riittävän laaja erilaisten mitattavien suureiden normaaliarvoaineisto ja tietoja normaaliarvoihin vaikuttavista ei-toksisista tekijöistä. Erisuuruisten muutosten merkityksen selvittäminen vaatii vielä runsaasti perustutkimusta.

3.28 S u b l e t a a l i t e s t i e n s o v e l t a m i - s e s t a

Kaloilla tehtävien toksisuustestien ehkä tärkeimmät sovellutukset ovat nykyisin niiden käyttö jäteveden laadun valvonnassa, vesistön tilan seurannassa ja jätevesien sisältämien myrkkyjen enimmäispitoisuusnormien laadinnassa. Koska kalat aistivat nisäkkäille myrkyllisten yhdisteiden hyvin pieniä pitoisuuksia, kaloja voidaan käyttää myös talousveden laadun valvonnassa. Kokeissa mitattavat suuret ja mittaustekniikka vaihtelevat testien tarkoitusten mukaan.

Mitattavan suureen arvon muuttuminen subletaalitesteissä voi olla melko epämääräinen myrkyvaikutuksen ilmentäjä: minkä asteinen ja minkä suuntainen muutos on millä tavalla kaloille haitallinen. Vielä vaikeampaa on osoittaa muutoksen vahingollisuus vesistössä kalapopulaatiolle tai kalakannalle. Laboratoriokokeiden tulokset ovatkin vain viitteellisiä ja ne tulisi aina mahdollisuuksien mukaan varmistaa kenttäkokein ennen niiden soveltamista.

Kaikilla edellä käsitellyillä testeillä voidaan osoittaa myrkyjen vaikuttavan kalan elintoimintoihin. Menetelmien herkkyys ja käyttökelpoisuus vaihtelevat tutkittavien aineiden mukaan. Eri tutkijoiden mielipiteet menetelmien herkkyydestä ja käyttökelpoisuudesta vaihtelevat.

SPRAGUE (1976) on vertaillut erilaisten subletaalitestien herkkyyttä ja soveltuvuutta biologisesti turvallisten pitoisuuksien määrittämiseen. Parhaimmat tulokset saatiin tutkimalla myrkkyyden vaikutuksia kalojen nuoriin kehitystasoihin.

Asetettaessa vesistöön päästettävälle jätevedelle laatuvaatimuksia lienevät lisääntymiskokeet luotettavin tapa arvioida jäteveden myrkyllisyyttä. Lisääntymiskokeissa tutkitaan myrkyvaikutuksia yksilön eri kehitysvaiheisiin, mikä on tärkeää kalapopulaation ja kalakannan säilymisen kannalta. SAUTER ym. (1976) tutkivat eräiden raskasmetallien vaikutuksia mädin ja poikasten kehittymiseen melko lyhytaikaisin, 30-60 vrk kestävin kokein. Tulokset olivat samansuuntaisia paljon pitempiaikaisissa kokeissa saatujen tulosten kanssa. Tutkijoiden mielestä mädin ja poikasten kehittymisen tutkiminen on nopea ja luotettava menetelmä kroonisen myrkyllisyyden arvioimiseksi suhteellisen lyhytaikaisin kokein. Koeorganismi tai koeorganismit tulisi valita laatuvaatimusten asettamistarkoitusten mukaan: mikäli tarkoitus on turvata vesiekosysteemin häiriintymätön toiminta, kokeet olisi tehtävä herkimmän eliön herkimmillä kehitysvaiheella. Usein on tarkoituksenmukaista käyttää eri trofiatasojen organismeja.

Jätevesien laaduntarkkailumenetelmien kehittämisessä on ongelmana erilaiset jätevedet ja siten jätevesien erilaiset myrkyvaikutukset. Laaduntarkkailun olisi perustuttava aina sen suureen mittaamiseen, johon tutkittavan jäteveden myrkylliset yhdisteet vaikuttavat. Ensin on määritettävä myrkkyyden sallittavat enimmäispitoisuudet esimerkiksi lisääntymiskokein, jolloin olisi otettava huomioon jäteveden laadun muutokset ja eri komponenttien yhteisvaikutukset. Tarkkailuun kytkettävän hälytysjärjestelmän tulisi perustua näin määritettyjen enimmäispitoisuuksien ylittymiseen.

Veden laadun automaattisessa biologisessa tarkkailussa kalat ovat jatkuvasti tutkittavalle vedelle tai sen laimennukselle alttiina valvotuissa oloissa. Eri puolilla maailmaa on tutkittu lähinnä kalojen hengitysfrekvenssien, aktiivisuuden ja rheotaksisuuden mittaamiseen perustuvia menetelmiä, joista vain muutamia on kehitetty käytännön veden laadun tarkkailuun soveltuviksi.

Windhoekissa Namibiassa (MORGAN 1977) ja Virginiassa Yhdysvalloissa (WESTLAKE ja van der SCHALIE 1977) tarkkaillaan teollisuusjätevesien laatua mittaamalla kalojen hengitysfrekvenssien muuttumista. Alimmat menetelmällä havaitut myrkkypitoisuudet ovat olleet 5-10 % vastaavan myrkyin $LC50_{48h}$ -arvoista ja kuolettavat pitoisuudet on havaittu 2-4 tunnin kuluessa (MORGAN 1977). Mittaustulosten analysointi on melko monimutkaista, Virginiassa käytetään tulosten analysoinnissa tietokoneohjelmaa (WESTLAKE ja van der SCHALIE 1977). Hälytystilanteita ei ole havaittu tarkkailun aikana.

Englannissa kehitellään SPOORin ym. (1971) metodia automaattiseksi biologiseksi veden laadun tarkkailumenetelmäksi. Samanaikaisesti mitataan useita kalan bioelektrisiä signaaleja: sydämenlyöntejä, kiduskansien liikkeitä ja kalan aktiivisuutta.

POELS (1975, 1977) on kehittänyt Hollannissa rheotaksisuuteen perustuvan veden laadun tarkkailumenetelmän. Laitteistoa testattiin Rein-joella neljän vuoden ajan, mutta hälyttävää veden laadun muuttumista ei havaittu (C.L.M. Poels, kirjeell. tied. 20.3.1978). Laitteiston herkkyyttä on tutkittu laboratoriokokein, joissa on havaittu kalojen reagoivan nopeasti ns. klassisiin myrkkuihin, syanidiin ja lindaaniin. Raskasmetalleihin reagoiminen on huomattavasti hitaampaa. Havaitut pitoisuudet ovat yleensä melko suuria, jopa $LC50_{96h}$ -arvoa suurempia (liite 1). Reinillä menetelmää käytettiin juomaveden laadun tarkkailuun. SALMELA (1978) tutki hollantilaisen mallin mukaan rakennetun laitteiston soveltuvuutta teollisuusjätevesien kuormittaman vesistön veden laadun tarkkailuun. Laitteisto toimii kuitenkin niin huonosti, ettei koeajalta saatu luotettavia tuloksia. Ruotsissa vastaavantyyppinen laitteisto on käytössä Ryan puhdistamolla puhdistetun jäteveden laadun tarkkailussa (HASSELROTH 1975).

4. K O E J Ä R J E S T E L Y T

Tutkimuksessa käytettiin hollantilaisen mallin (POELS 1975, 1977) mukaan rakennettua automaattista biologista veden laadun tarkkailulaitteistoa, joka on kehitetty veden laadun äkillisten, kaloille haitallisten muutosten havaitsemista varten. Veden laadun muutok-

sia ilmentävät kirjolohet (Salmo gairdneri), joiden reagoimisen laitteisto rekisteröi. Kalat reagoivat aistimaansa veden laadun äkilliseen muutokseen tulemalla levottomiksi ja yrittämällä paeta. Virtaavassa vedessä kalat menettävät vähitellen myrkkyyvaikutuksen edetessä positiivisen rheotaksisuusensa ja valuvat virran mukaan. Levottomuus, pakoreaktio ja positiivisen rheotaksisuuden heikkeneminen lisäävät kalan käyntimäärää koealtaan takaosassa, minkä laitteisto rekisteröi.

Tässä työssä tutkittiin Suomessa rakennetun, kesällä 1977 Kymi-joella kokeiltavana olleen laitteiston toimivuutta laboratoriossa ja testattiin äkillisten myrkkypäästöjen avulla menetelmän käyttökelpoisuutta. Samalla seurattiin myrkkujen vaikutusta kalojen hengitysfrekvensseihin.

Laitteiston toimivuutta seurattiin havainnoimalla erilaisten toimintahäiriöiden esiintymistiheyttä ja laatua. Menetelmän käyttökelpoisuutta selvitettiin myrkyllisyyskokein. Kokeissa käytettäviksi myrkyllisiksi aineiksi valittiin sinkki- ja kuparisulfaatti, jotka ovat tunnetusti kaloille myrkyllisiä yhdisteitä ja joiden haittavaikutuksista kaloihin on olemassa runsaasti tutkimuksia. Sinkin ja kuparin on todettu aiheuttavan mm. kalojen aktiivisuuden ja hengitysfrekvenssien suurenemista (esim. SPARKS ym. 1972, WALLER ja CAIRNS 1972, MORGAN ja KÜHN 1974, C.L.M. Poels, kirjeell. tied. 20.3.1978).

Käytännön sovellutusten kannalta on erittäin tärkeää kalojen myrkyä havaitsemiseen tai myrkyä vaikutusten ilmenemiseen kuluvan ajan pituus: ajan on oltava riittävän lyhyt, jotta voidaan ajoissa ryhtyä toimenpiteisiin äkillisen veden laadun muutoksen aiheuttajan selville saamiseksi ja tilanteen korjaamiseksi. Tästä syystä äkillisen myrkkypäästön vaikutusta seurattiin vain kahden tunnin ajan. Koska koeaika oli lyhyt, kalojen suurentunut käyntimäärä altaan takaosassa johtui pääasiassa levottomuudesta ja pakoreaktiosta eikä rheotaksisuuden heikkenemisestä. Tärkeää on myös kalojen havaitsema myrkkypitoisuuden alaraja: reagoivatko kalat kuolettavaa pitoisuutta pienempiin myrkkypitoisuuksiin. Toisaalta kalat eivät saisi reagoida liian herkästi. Koska kalat joutuvat jat-

kuvasti alttiiksi pienille myrkkypitoisuuksille laitteiston ollessa maastokäytössä, on varmistuttava siitä, etteivät kalat menetä reagointikykyään. On mielenkiintoista tietää myös reagoimiskyvyn säilyvyys toistuviin suuriin myrkkypitoisuuksiin. Eri raskasmetallien synergistiset vaikutukset sekä raskasmetallien ja kalsiumin antagonistiset vaikutukset ovat tärkeitä kalojen reagoimiseen vaikuttavia tekijöitä, mutta näitä vaikutuksia ei kokeissa selvitetty.

Kalojen reagoimista havainnoitiin kahdella tavalla. Laitteisto rekisteröi kalojen liikehdinnän muutoksia. Visuaalisesti seurattiin kalojen levottomuutta ja sekuntikelloa apuna käyttäen kalojen hengitysfrekvenssien muuttumista. Ennen kokeita määritettiin kunakin kalan käyntitiheys altaan takaosassa ja hengitysfrekvenssi normaalioloissa (= laimennusvedessä ilman myrkkyä). Kokeissa saatuja arvoja verrattiin näin määritettyihin normaaliarvoihin.

Kokeilla pyrittiin saamaan selville seuraavia seikkoja:

1. Mitkä ovat pienimmät sinkki- ja kuparipitoisuudet, jotka suurentavat
 - a. koekalojen aktiivisuutta (= käyntimäärää altaan takaosassa).
 - b. koekalojen hengitysfrekvenssejä.
2. Kuinka nopeasti kalat havaitsevat sinkin tai kuparin läsnäolon, kuinka voimakkaasti kalat reagoivat, ja onko kuparin ja sinkin aiheuttamien reaktioiden välillä eroa.
3. Reagoivatko kalat, jos myrkkyyannos kaksin-, kolmin- tai kymmenkertaistetaan kahden tunnin koeajan jälkeen.
4. Pystyvätkö kalat reagoimaan toistuvasti, jos ne saavat toipua puhtaassa vedessä noin vuorokauden ajan ennen kokeen toistamista.
5. Säilyttävätkö kalat havaitsemis- ja reagoimiskykynsä, jos ne altistetaan tutkittavan aineen pienelle pitoisuudelle muutaman viikon ajan ennen varsinaista koetta.

6. Ilmentävätkö hengitysfrekvenssien kasvu ja laitteiston havaitsema aktiivisuuden kasvu yhtä herkästi kaloille haitallista veden laadun äkillistä muuttumista.
7. Reagoivatko kalat yksilöllisesti.

4.1 KOEKALAT

Kokeissa käytettiin Saarioisten Kangasalta toimittamia kaksikesäisiä keskimäärin 20 cm:n pituisia ja 100 g:n painoisia kirjolohia (Salmo gairdneri). Koekalojen pituudet ja painot ovat liitteessä 2.

Kaloja sopeutettiin kokeissa käytettyyn laimennusveteen ja lämpötilaan vähintään kaksi viikkoa. Sopeutus- ja samalla varastointialtaana oli muovinen noin 300 dm³ vetoinen saavi. Saavin vesimäärä 270 dm³ riitti 27 noin 100 g:n painoisen kalan varastointiin - SPRAGUE (1973) mukaan vettä on varattava vähintään litra kymmentä kalagrammaa kohti, jotta välttyttäisiin ylitiheyden aiheuttamilta haitoilta. Varastointialtaaseen virtasi jatkuvasti uutta vettä 1,6 - 2,4 dm³ min⁻¹, mikä on riittävä määrä 1,6 - 2,4 kalakilogramman tuottamien jätteen poistamiseksi (SPRAGUE 1973). Vesi poistui saavin seinässä olevan reiän ja letkun kautta viemäriin. Vettä ilmastettiin jatkuvasti. Saavin päällä oli muoviverkko, sillä varsinkin nälkäiset kalat yrittivät hyppiä lattialle. Kalat ruokittiin kaksi kertaa vuorokaudessa Ewos Kasvatus Standard -kirjolohirehulla. Kalat söivät varastointialtaassa halukkaasti ja kasvoivat varastoinnin aikana: viimeisissä kokeissa käytetyt kalat olivat noin 25 cm:n pituisia. Varastointialtaasta poistettiin ruoantähteitä ja kalojen ulosteita päivittäin pienisilmäisellä haavilla. Vesi vaihdettiin kerran viikossa.

4.2 KOELAITTEISTO

4.2.1 L a i t t e i s t o n o s a t

Koeallas koostuu kahdesta akryylimuovisesta päätyaltaasta ja kolmesta rinnakkaisesta läpivirtausaltaasta. Läpivirtausaltaissa on

kussakin kaksi mittausanturia, joiden havainnot siirtyvät elektronisen laskentayksikön kautta tulostuslaitteeseen. Tulostukseen on kytketty Leeds & Northrup Speedomax 30 -piirturi. Laitteistoon kuuluu myös ruokinta-automaatti, jota ei lyhytaikaisissa laboratoriokokeissa käytetty. Laitteiston rakenne käy selville sivuilla 41 ja 42 olevista kuvista 3 ja 4.

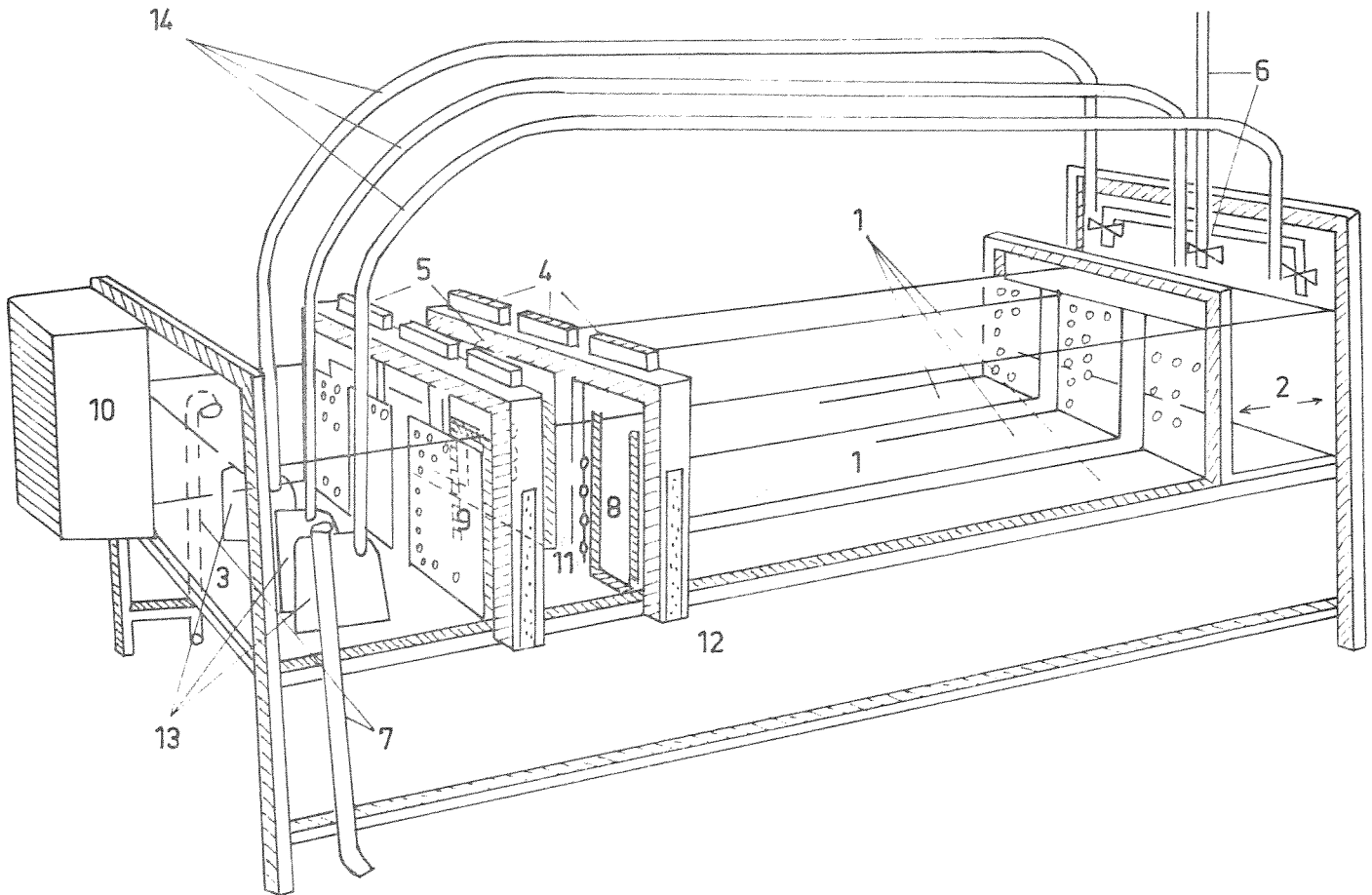
Akryylimuovialtaan ulkomitat ovat: 2,00 m (pituus) · 0,85 m (leveys) · 0,25 m (korkeus). Rinnakkaiset osa-altaat ovat 1,50 m pitkiä ja 0,20 m leveitä. Veden korkeus altaassa on 0,15 m, jolloin altaassa on vettä noin 194 dm^3 . Allassysteemi on sijoitettu noin 0,70 m korkean teräsputkikehikon varaan.

Mittausanturit ovat läpivirtausaltaiden päälle ulkopuolelle asetettavia puukehikoita, joiden sivuseiniin on upotettu toiselle puolelle 24 V lamput ja toiselle puolelle LDR (Light Dependent Resistant) -vastukset. Kussakin anturissa on neljä noin 9 mm:n etäisyydellä toisistaan olevaa lamppua, joista tuleva valo kohdistuu vastapäisiin neljään vastukseen. Vastusten eteen on asennettu pienet kokoojalinssit. Kussakin läpivirtausaltaassa on kaksi anturia, jotka ovat säädettävällä etäisyydellä, näissä kokeissa noin 10 cm:n etäisyydellä toisistaan. Antureiden vieressä sijaitsevat alumiinielektrodit - positiivinen elektrodi etuanturin edessä, negatiivinen taka-anturin takana. Elektrodien välille on kytketty 20 V:n jännite.

Laskentayksikkö ja tulostuslaitteet koostuvat seuraavista komponenteista:

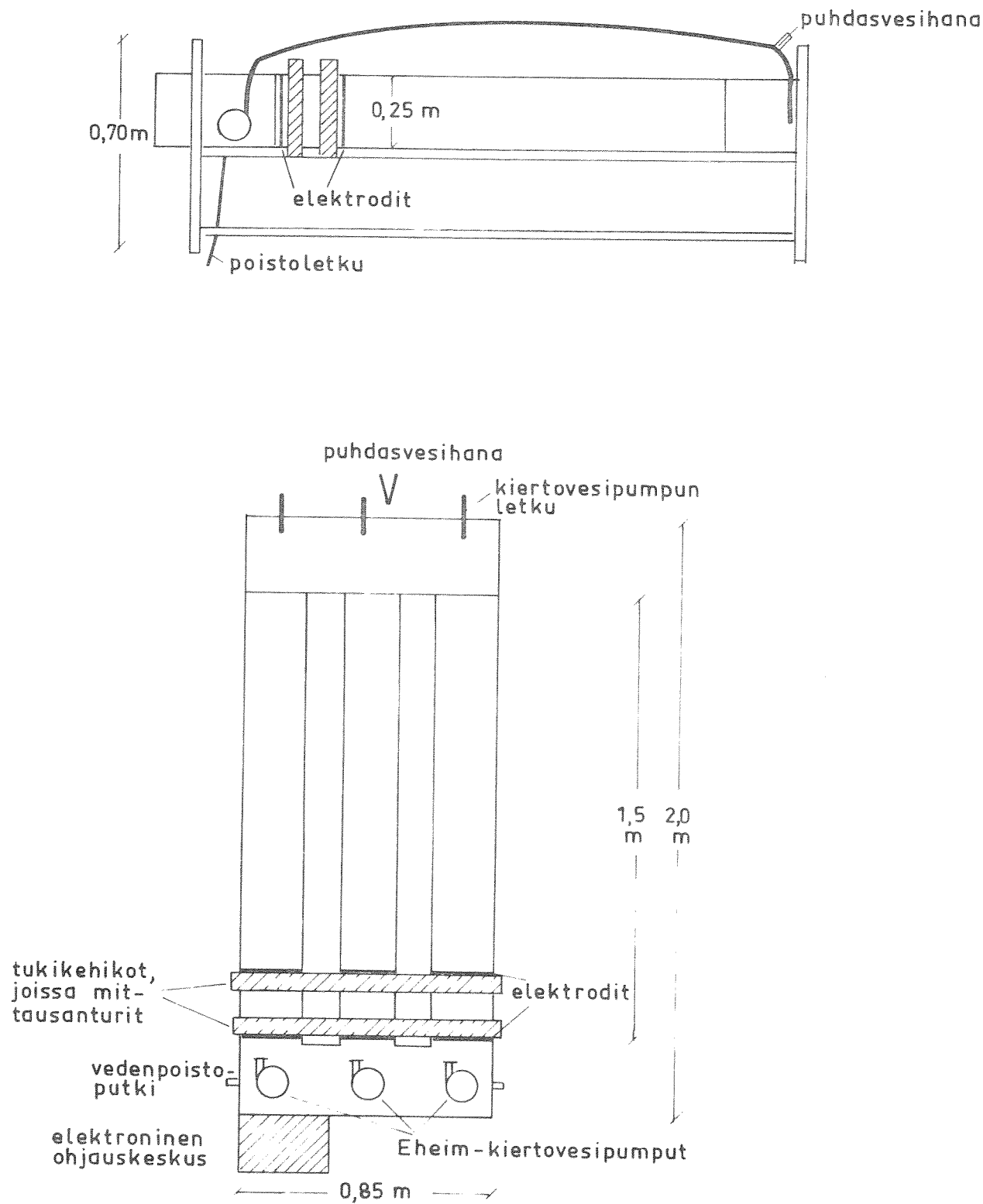
- 3 pulssinlaskija- ja vahvistinkorttia
- 1 kellopiirikortti
- 1 vahvistinkortti
- 1 hälytysohjauskortti
- 6 pulssilaskuria

Elektroniikka on toteutettu TTL- ja transistoritekniikalla. Laskentakeskuksen jännite on 220 V, toimintajännitteet 5 V (mikropiirit), 12 V (transistorit) ja 24 V (laskurit) saadaan muuntajilta.



1. Osa-altaat, joissa kussakin yksi kirjolohi
2. Etuallas } Päätyaltaat
3. Taka-allas }
4. Tukikehikot (3 kpl), joissa etuanturit
5. Tukikehikot (3 kpl), joissa taka-anturit
6. Vedentuloputki ja hana
7. Vedenpoistoputket
8. Anodi } Elektrodit
9. Katodi }
10. Elektroninen ohjauskeskus, jossa pulssilaskurit ja hälytysilmaisimet
11. Resistorit
12. Lamput (tukikehikon sisäpuolella)
13. Pumput
14. Kiertovesiletkut

Kuva 3. Koelaitteisto SALMELÄN (1978) mukaan.



Kuva 4. Kaavio koelaitteistosta SALMELAn (1978) mukaan.

SALMELA (1978) esitti Kymijoella tehtyjen havaintojen perusteella laitteistoon tehtäväksi seuraavat parannukset:

1. Lisättävä piirtureiden toimintavarmuutta.
2. Lisättävä pulssilaskureiden toimintavarmuutta.
3. Lisättävä taka-antureiden toimintavarmuutta.
4. Siirrettävä etuanturit taaemmaksi.
5. Rakennettava rinnakkaislaitteisto.

Kohdat 2., 3. ja 4. saatiin korjatuksi. Käytettävissä oli piirturi, joka Kymijoella toimi huonosti piirturinopeudella 20 cmh^{-1} . Piirturiin vaihdettiin hitaampi moottori, jolloin piirturipaperi kulki vain 2 cmh^{-1} , mikä on liian pieni nopeus, jotta yksittäiset pulssit kyettäisiin havaitsemaan ja laskemaan piirturipaperilta. Koska työn tarkoitus oli testata menetelmän käyttökelpoisuuden ohella laitteiston toimivuutta, ei rinnakkaislaitteiston rakentaminen ollut vielä ajankohtaista eikä varojen puutteen vuoksi mahdollista.

Kymijoella koelaitteisto oli pimeässä laitehuoneessa, koska haja valo häiritsi laitteen LDR-vastusten toimintaa. Keväällä 1978 laitteiston herkkyyttä parannettiin vaihtamalla 2,2 V linssilamput 24 V lamppuihin ja asentamalla vastusten eteen kokoojalinssit. Laitteisto toimi näiden muutosten jälkeen yhtä hyvin valossa kuin pimeässä.

4.22 L a i t t e i s t o n t o i m i n t a p e r i a a t e

Koelaitteiston kussakin rinnakkaisessa osa-altaassa on yksi kala, jonka liikehdinnän muutoksia laitteisto rekisteröi. Laitteistolla havaitaan kalojen levottomuus, pakoreaktio ja rheotaksisuuden heikkeneminen kalan tihentyneinä käynteinä altaan takaosassa, jolloin kala katkaisee yhden tai useamman lampuista LDR-vastuksiin kohdistuvan valonsäteen normaalia useammin. Valonsäteiden katkeamiset rekisteröityvät pulssilaskurille ja edelleen piirturille. Kun kala menee etuanturin ohi etuanturin laskuri rekisteröi yhden pulssin.

Kalan käyminen taka-anturin luona aiheuttaa yhden pulssin taka-anturin laskuriin - taka-antureiden tarkoitus on rekisteröidä hyvin huonokuntoiset ja kuolemaisillaan olevat kalat. Siten antureiden pulssimäärän pitäisi olla suoraan verrannollinen kalan käyntitiheyteen altaan takaosassa. Pulsseja syntyy kuitenkin myös silloin, kun kala heiluttelee pyrstöään anturin edessä tai uiskentelee levottomasti antureiden välissä.

Aina etuanturin lampusta tulevan valonsäteen katkettua syntyy elektrodien välille 20 V sähkökenttä, mikä antaa kalalle sähköiskun. Sähköisku, joka kestää 10 sekuntia ja koostuu 10 ms:n tasavirtapulsseista, karkottaa kalan takaisin altaan etuosaan. Elektrodien välille syntyy sähkökenttä myös automaattisesti kahden minuutin välein. Kalan saaman sähköiskun voimakkuus riippuu oleellisesti altaassa olevan veden sähkönjohtavuudesta, koska elektrodit ovat vedessä.

Laitteistossa on kahdesta osasta koostuva hälytysjärjestelmä. Etuantureihin kytketty hälytys voidaan säätää siten, että hälytystieto syntyy, kun kaksi kalaa aiheuttaa 1 - 15 pulssia saman 15 minuutin laskentajakson aikana. Hälytyksen syntymiseen vaaditaan siten kahden kalan samanaikainen reagointi, sillä yhden kalan reagoimiseen perustuva hälytysjärjestelmä olisi kalojen yksilöllisyyden vuoksi huomattavasti epäluotettavampi. Taka-antureihin kytketty hälytystieto syntyy, kun kaksi kalaa on vähintään 5 minuuttia taka-anturin luona. Viiden minuutin aikana kala saa kaksi kahden minuutin välein toistuvaa sähköiskua, minkä pitäisi karkottaa terveet kalat altaan etuosaan.

4.23 V e s i j ä r j e s t e l y t

Veden virtausnopeuden on oltava koealtaassa riittävän suuri, jotta kalat pyrkisivät aktiivisesti uimaan vastavirtaan. KIWA:n (1977) ohjeiden mukaan virtauksen on oltava vähintään 150 m h^{-1} ($= 4,16 \text{ cm s}^{-1}$), jolloin vedentarve olisi noin $13,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Kokeissa käytettiin aktiivihiihtisuodatettua johtovettä, jota oli suotimien pienen kapasiteetin vuoksi käytettävissä rajoitettu määrä. Vedentarveongelma rat-

kaistiin käyttämällä kokeissa kolmea takimmaiseen päätyaltaaseen sijoitettua Eheim 691 NA-kiertovesipumppua, joiden avulla saatiin kuhunkin osa-altaaseen riittävä virtausnopeus, noin $180 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ($= 5,00 \text{ cms}^{-1}$).

Pumpuista etualtaaseen johdetut letkut olivat elintarvikekumia. Veden virtausnopeus mitattiin RhodaminB -merkkiaineen avulla. Veden kierrätyksen ansiosta tarvittiin kokeissa huomattavasti vähemmän paitsi vettä myös tutkittavia myrkyllisiä yhdisteitä kuin mitä olisi tarvittu läpivirtausta käytettäessä.

Eheim-pumput olivat vesijäähdytteisiä ja siten koealtaaseen sijoitettuna lämmittivät koevettä. Pumppujen ja huoneilman aiheuttama veden liiallinen lämpeneminen estettiin syöttämällä altaaseen jatkuvasti kylmää aktiivihiilisuodatettua johtovettä tarpeen mukaan $0,102 - 0,180 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

Aktiivihiilisuodatettu vesi varastoitiin katon rajassa olevaan muovisaaviin, josta se virtasi tasaisella paineella PVC-putkistossa etummaiseen päätyaltaaseen. Veden tulonopeutta voitiin säätää putkiston altaan puoleisessa päässä olevan hanan avulla $0 - 0,270 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

Vesi poistui altaan seinään $0,15 \text{ m:n}$ korkeudelle poratun reiän kautta viemäriin. Allas tyhjennettiin kokeiden välillä lapolla, ja jäljelle jäänyt vesi poistui taka-altaan pohjaan porattujen reikien kautta.

4.3 KOKEET

Kokeet tehtiin vesihallituksen kalalaboratoriossa 25.4. - 3.8. Yhteensä tehtiin 20 erillistä koetta.

4.31 K o e o l o t

4.311 Valaistus

Kalalaboratorio on valaistu Airam3 -loisteputkin (lämmin valkea valo). Valaistus oli säädetty siten, että 12 tunnin pituiset pimeät ja valoisat jaksot vuorottelivat. Päivällä klo 7.30 - 19.30 valaistuksen voimakkuus kalojen varastointi- ja koealtaan päällä oli noin 140 luxia (Gossen Panlux-valaistusmittari). Yöllä klo 19.30 - 7.30 kattovalot olivat sammuksissa, vain mittaasantureiden lamput paloivat.

4.312 Laimennusveden laatu

Aktiivihiilisuodatetun johtoveden lämpötila mitattiin elohopealämpömittarilla joka toinen päivä. pH mitattiin aluksi viikottain Datex IM-555 -mittarilla. Huhtikuun loppupuolella veden varastointialtaaseen asennettiin jatkuva pH-mittaus (Kentin pH transmitter 6320). Mittarilukema merkittiin muistiin viikottain.

Aktiivihiilisuodatetun johtoveden lämpötila muuttui huhti-elokuun aikana $5,7 \rightarrow 18,1$ °C ja pH $7,7 \rightarrow 8,2$. pH-arvot 6,5 - 8,5 ovat yleensä kaloille haitattomia, mutta erilaisten aineiden myrkyllisyys saattaa muuttua näin laajalla pH-alueella. SPRAGUE (1973) suositteleeekin toksisuustesteissä käytettäväksi pH-alueeksi pH 7,8 - 8,3.

Aktiivihiilisuodatetusta johtovedestä otettiin tarkempaa analysointia varten näytteet kolme kertaa koejakson aikana. Näytteet analysoitiin vesihallituksen käytössä olevien menetelmien mukaan. Analyysitulokset ovat taulukossa 1.

Veden sähkönjohtavuus $24,5 - 27,0 \text{ mSm}^{-1}$ oli huomattavasti suurempi kuin SALMELAN (1978) tutkimuksessa Kymijoella, jossa sähkönjohtavuus vaihteli $4,7 - 10,7 \text{ mSm}^{-1}$. Siten kalojen saama sähköisku oli laboratoriokokeissa ilmeisesti voimakkaampi kuin Kymijoella, missä käytettiin samanlaisia sähköiskujärjestelyjä ja samankokoisia, terveitä kaloja.

Taulukko 1. Aktiivihiilisuodatetun johtoveden laatu.

| analyysi | päivämäärä | | |
|---------------------------------------|------------|------|------|
| | 27.4. | 3.7. | 31.7 |
| pH | 7,7 | 8,2 | 8,0 |
| χ_{25} (mSm^{-1}) | 24,5 | 27,0 | 27,0 |
| alkaliniteetti (mval^{-1}) | 0,60 | 0,75 | 0,78 |
| Na (mg l^{-1}) | - | 11,0 | 12,0 |
| K (mg l^{-1}) | - | 4,1 | 4,1 |
| Ca+Mg (mmol l^{-1}) | 1,20 | 0,85 | 0,90 |
| Cu ($\mu\text{g l}^{-1}$) | 14 | 5 | 5 |
| Zn ($\mu\text{g l}^{-1}$) | 1 | 18 | 1 |

Veden alkaliniteetti eli hapon sitomiskyky kuvaa veden kykyä vastustaa happojen tai emästen aiheuttamaa pH:n vaihtelua. Aktiivihiilisuodatetun johtoveden alkaliniteetti oli $0,60 - 0,78 \text{ mval}^{-1}$, mikä on melko suuri Suomen pintavesien alkaliniteettiin verrattuna (LAAKSONEN 1969).

Kaloilla tehtävissä toksisuustesteissä on laimennusveden oikea fysiologinen koostumus tärkeää - esimerkiksi kaliumin ja natriumin puute vaikuttaa haitallisesti kalojen aineenvaihduntaan (BROWN 1976). Aktiivihiilisuodatetussa johtovedessä oli runsaasti natriumia ($11,0 - 12,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Na}^+$) ja kaliumia ($4,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ K}^+$).

Veden kovuus vaihteli $0,85 - 1,20 \text{ mmol}^{-1} \text{ Ca+Mg}$, mikä vastaa noin $85 - 120 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$. SPRAGUE (1973) luokittelee toksisuustestejä varten pehmeäksi veden, jonka kovuus on korkeintaan $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ja kovaksi veden, joka sisältää noin $200 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Laimennusveden sinkki- ja kuparipitoisuudet vaihtelivat analyysitarkkuutta pienemmistä pitoisuuksista arvoihin 18 ja $14 \mu\text{g l}^{-1}$ ja olivat siten kokeiden kannalta merkityksettömän pieniä.

4.313 Kalojen varastointi- ja koealtaan veden lämpötila ja happipitoisuus

Koealtaan veden lämpötila mitattiin tavallisella elohopealämpömittarilla kokeiden aikana kahdesti, normaaliarvoja määritettäessä kerran päivässä. Veden lämpötila normaaliarvoja määritettäessä ja kokeen aikana oli yleensä sama. Kalojen varastointialtaan lämpötila mitattiin kerran päivässä.

Laboratoriossa ei ollut huoneilman eikä veden jäähdytysjärjestelmää, joten kokeet tehtiin normaalissa huoneen lämpötilassa (noin $+20^{\circ}\text{C}$) aktiivihiilisuodatetulla johtovedellä, jonka lämpötila kasvoi koejakson aikana. Lisäksi koealtaan vesi lämpeni huoneenlämmössä. Koeveden lämpötilaan voitiin vaikuttaa jonkin verran säätämällä aktiivihiilisuodatetun johtoveden tulovirtausta siten, että lämpötila pysyi vakiona kunkin kokeen aikana. Koeveden lämpötila kasvoi koejakson aikana $11,5 \rightarrow 19,8^{\circ}\text{C}$, mutta pysyi yksittäisten kokeiden aikana likimain vakiona. KATZin (1971) mukaan kylmän veden kaloilla tehtävissä kokeissa suositeltava veden lämpötila on $12 - 18^{\circ}\text{C}$, SPRAGUE (1973) suosittelee 15°C :ta. Varastointialtaan vesi lämpeni koejakson aikana vähitellen $6,5 \rightarrow 18,5^{\circ}\text{C}$.

Koealtaan ja kalojen varastointialtaan veden happipitoisuus määritettiin Winklerin menetelmällä kokeiden suunnitteluvaiheessa ja tarkistusluonteisesti muutaman kerran koejakson aikana (taulukko 2). Koealtaan suuresta pinta-alasta tilavuuteen verrattuna ja veden tehokkaasta sekoittumisesta johtuen veden happipitoisuus pysyi lähellä kyllästysastetta. Kalojen varastointialtaassa oli happea kulutettavaa orgaanista ainesta (ulosteet ja ruoantähteet), mutta tehokas ilmastus esti happipitoisuuden liiallisen alenemisen. SPRAGUE (1973) mukaan happipitoisuus ei saisi laskea varastointi- eikä koeaikana enempää kuin 1 mgl^{-1} alle kyllästysasteen happipitoisuuden.

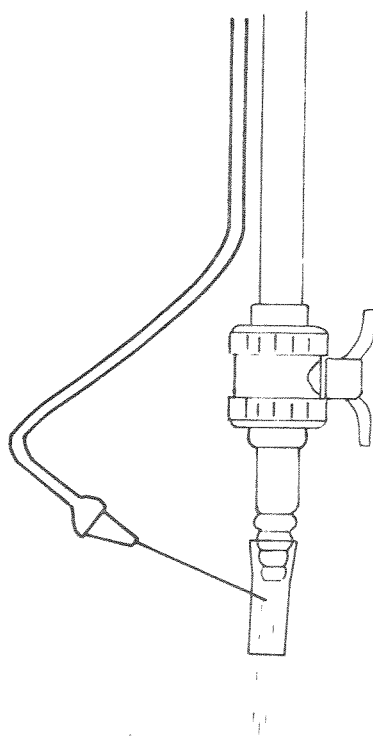
Taulukko 2. Koealtaan ja kalojen varastointialtaan happipitoisuudet.

| päivämäärä | lämpötila (°C) | O ₂ -pitoisuus (mg l ⁻¹) | kyllästysprosentti (%) |
|------------------|-------------------|--|---------------------------|
| 15.4. koeallas | 11,0 | 9,6 | 87,3 |
| varastointiallas | 6,5 | 8,8 | 71,5 |
| 20.6. koeallas | 17,5 | 8,1 | 84,4 |
| varastointiallas | 16,5 | 7,6 | 77,6 |
| 20.7. koeallas | 18,3 | 8,0 | 85,1 |
| varastointiallas | 17,3 | 8,2 | 85,4 |

4.32 Myrkyn syöttö

Kokeissa käytettiin Merckin sinkkisulfaattia ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) ja kuparisulfaattia ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) (pro analyse).

Koska koelaitteisto on suunniteltu havaitsemaan äkillisiä veden laadun muutoksia, koealtaan veden raskasmetallipitoisuus nostettiin halutulle tasolle kerta-annoksella. Koska altaaseen jouduttiin syöttämään jatkuvasti uutta, puhdasta vettä koeveden liiallisen lämpenemisen estämiseksi, järjestettiin veden tulohanan yhteyteen myrkyn syöttö. Syöttöliuoksen väkevyys laskettiin veden tulovirtauksen mukaan. Myrkyn syötössä käytettiin ISMATEC mp-ge -letkupumpua ja ENE9 -pumppuletkua yhdistettynä silikoniletkuun. Syöttönopeutta voitiin säätää portaattomasti 0,5 - 3,4 mlmin⁻¹; yleensä käytettiin nopeutta 1 mlmin⁻¹. Silikoniletkun puhdasvesihanan puoleiseen päähän liitettiin injektioneula, joka työnnettiin hanan päähän laitetun muoviputken läpi siten, että myrkkyliuospisararat tippuivat puhdasvesisuihkuun - näin saatiin aikaan tehokas sekoittuminen (kuva 5). Tutkittaessa pitkäaikaisen sinkkialtistuksen vaikutusta kalojen reagoimiskykyyn noin 123 dm³:n vetoiseen lasiakvaarioon syötettiin sinkkiä samoin järjestelyin.



Kuva 5. Myrkyn syöttö laimennusveteen.

Kokeen alkaessa kaadettiin taka-altaaseen koealtaan vesimäärän ja halutun metallipitoisuuden mukaan laskettu määrä tislattuun veteen liuotettua metallisuolaa. Kiertovesipumput sekoittivat veden homogeeniseksi noin 2-3 minuutissa. Samalla aloitettiin myrkyn syöttö: tulevaan puhtaaseen veteen syötettiin metallisuolaliuosta siten, että tulevan veden metallipitoisuus oli sama kuin kerta-annoksella koealtaan veteen saatu myrkkypitoisuus. Raskasmetallipitoisuus pidettiin mahdollisimman vakiona kokeen ajan.

Taka-altaasta otettiin vesinäytteet metallipitoisuuden määrittämistä varten 5, 30, 60 ja 120 minuutin kuluttua kokeen aloittamisesta ja sinkkialtistusaltaasta päivittäin paitsi ei viikonloppuisin. Näytteet säilöttiin pipetoimalla 1 ml typpihappoa (1+1) noin 100 ml:aan näytettä. Sinkki- ja kuparipitoisuudet analysoitiin Perkin-Elmer 603 -atomiabsorptiospektrofotometrillä. Lisäksi mitattiin kokeen alkaessa koealtaan veden lämpötila ja pH.

4.33 Kokeiden suoritus ja tulosten analysointi

4.331 Kalojen sopeuttaminen ja normaaliarvojen mittaaminen

Kaloja sopeutettiin varastoaltaassa vähintään kaksi viikkoa ennen kokeita. Koetta varten kuhunkin rinnakkaisaltaaseen laitettiin satunnaisessa järjestyksessä yksi kala ja annettiin kalojen totutella vuorokauden ajan. Tämän jälkeen määritettiin kalojen aiheuttama normaali pulssimäärä ja normaali hengitysfrekvenssi, joihin kokeissa mitattuja pulssimääriä ja hengitysfrekvenssejä verrattiin. Jokainen kala oli siten itsensä kontrolli, mikä on välttämätöntä kalojen yksilöllisyyden vuoksi. Koska laitteistossa oli vain kolme rinnakkaisallasta, ei voitu pitää ympäristöolojen ja laimennusveden laadun muutosten havaitsemiseksi kontrollikalaa täsmälleen koeoloja ilman myrkynsyöttöä vastaavissa oloissa. Koelaitteiston vieressä oli vesitilavuudeltaan noin 123 dm³ suuruinen lasinen allas, jossa oli veden läpivirtaus. Seuraamalla lasialtaassa olevia kaloja voitiin havaita esimerkiksi äkillisestä melusta tai laimennusveden laadun muutoksesta aiheutunut levottomuus tai hengitysfrekvenssien kasvu.

Normaaliarvoja määritettäessä merkittiin pulssimäärät muistiin lasikureilta 15 minuutin välein 5 tunnin ajan, varsinaisissa kokeissa vastaavasti kokeen koko kestoajan. Hengitysfrekvenssit mitattiin normaaliarvoja määritettäessä 30 minuutin välein 5 tunnin ajan, varsinaisissa kokeissa 5, 15, 30, 45, 60, 90 ja 120 minuutin kuluttua kokeen alkamisesta. Kaloja seurattiin myös visuaalisesti. Sekä normaaliaktiivisuutta määritettäessä että varsinaisten kokeiden aikana havaitut kalan pyrstön aiheuttamat pulssit jätettiin huomioon ottamatta.

Koealtaassa olevia kaloja ei ruokittu.

4.332 Kalojen reagoiminen ja hälytyshavainto

Koska kalojen aiheuttamat pulssimäärät olivat pelkässä laimennusvedessä suuria ja vaihtelivat melkoisesti eri 15 minuutin mittaus-

jaksoilla, ei reagoimiskriteerinä voitu käyttää tietyn ennalta asetetun pulssimäärän ylittymistä.

Pulssimääräaineisto ei soveltunut tilastolliseen käsittelyyn, joten pulssimääriä analysoitiin vertaamalla kokeen suurinta pulssimäärää normaaliolojen suurimpaan pulssimäärään, minkä perusteella määritettiin kalan reagoiminen äkilliseen veden laadun muutokseen.

Hengitysfrekvenssin perusteella kalan katsottiin reagoineen äkilliseen veden laadun muutokseen, jos hengitysfrekvenssi koeaikana oli suurempi kuin normaalioloissa mitattu suurin hengitysfrekvenssi. Tulosten tulkinnessa otettiin huomioon puolen minuutin mittausajasta johtuva $\pm 2 \text{ min}^{-1}$ -suuruinen mittausvirhe.

Kalojen hengitysfrekvenssit vaihtelivat myös normaalioloissa joskus melkoisesti, ja usein oli havaittavissa yksi muita huomattavasti suurempi hengitysfrekvenssiarvo, jonka ylittyminen koeaikana katsottiin kalan reagoimiseksi. Normaalioloissa havaitun suurimman hengitysfrekvenssin ylittymiseen perustuva kalan reagoiminen voitaisiin olla liian epäherkkä reagoimiskriteeri. Hengitysfrekvenssituloksia käsiteltiin myös toisella tavalla: laskettiin normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille 99 % luotettavuusraja, joista ylärajan ylittyminen koeaikana katsottiin merkiksi kalojen reagoimisesta (esim. MORGAN ja KÜHN 1974).

Eräät tutkijat, mm. MORGAN (1972), SPARKS ym. (1972), ovat käyttäneet hengitysfrekvenssitulosten analysoinnissa F-testiä, jossa tutkitaan kahden varianssin homogeenisuutta. Myrkkyyvaikutuksen alaisena pitemmän aikaa olevan kalan hengitysfrekvenssi vaihtelee yleensä suurten ja normaaliarvojen välillä, mutta voi myrkystä riippuen olla myös normaalia pienempi. Tutkijat katsoivat kalan reagoineen tiettyyn raskasmetallipitoisuuteen, jos hengitysfrekvenssien varianssit normaalioloissa ja kokeen aikana poikkesivat toisistaan merkitsevästi. Menetelmä ei kuitenkaan soveltunut tämän työn aineistolle, sillä joskus normaalioloissa mitattujen hengitysfrekvenssien varianssi oli huomattavasti suurempi kuin kokeen aikana, jolloin olisi saatu väärä reagoimishavainto.

Tässä tutkimuksessa katsottiin siis, että kala reagoi veden laadun äkilliseen muutokseen, kun

1. kalan aiheuttama etuantureiden pulssimäärä/15 min oli suurempi kuin normaalioloissa mitattu suurin etuantureiden pulssimäärä/15 min.
- 2a. kalan hengitysfrekvenssi oli suurempi kuin normaalioloissa mitattu suurin hengitysfrekvenssi.
- 2b. kalan hengitysfrekvenssi ylitti normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille laskettujen 99 % luotettavuusrajojen ylärajan.

Hälytyshavainnon eli hälyttävän veden laadun muutoksen kriteeriksi otettiin kahden kalan reagoiminen saman 15 minuutin mittausjakson aikana. Koska etuantureiden pulssimääriin perustuvan hälytyshavainnon kriteeri poikkesi laitteistoon rakennetun hälytysjärjestelmän hälytyshavainnon kriteeristä, hälytysjärjestelmä oli kytketty pois toiminnasta.

Myös taka-antureihin kytketty hälytysjärjestelmä oli huonon toimivuutensa vuoksi kytketty pois toiminnasta.

4.333 Kalojen yksilöllisyys ja raskasmetallipitoisuuden vaikutus reagoimisvoimakkuuteen

Kalat käyttäytyvät yksilöllisesti: toiset kalat ovat huomattavasti aktiivisempia kuin toiset. Koekalojen erilaisuutta normaalioloissa ja kokeen aikana tutkittiin korrelaatioanalyysillä.

Kalojen reagoimisvoimakkuuden riippuvuutta sinkki- ja kuparipitoisuudesta tutkittiin regressioanalyysillä.

4.34 E s i k o k e e t

Ennen varsinaisia myrkkykokeita selvitettiin lämpötilan äkillisen nousun vaikutusta kaloihin, koeveden sähkönjohtavuuden suurenemisen vaikutusta kalojen saaman sähköiskun tehokkuuteen sekä kalojen rauhoittumiseen kuluvaan aikaan koealtaaseen siirtämisen jälkeen. Lisäksi seurattiin kalojen reagoimista kaloille myrkyttömien aineiden äkillisiin lisäyksiin.

Koealtaan lämpötila nousi huoneenlämmön vaikutuksesta noin $2,0^{\circ}\text{C}$ tunnissa, mikäli altaaseen ei syötetty uutta kylmää vettä. Lämpötilan kasvu oli nopeinta alhaisissa lämpötiloissa. Kalojen annettiin olla lämpenevässä vedessä 4,5 tunnin ajan, jolloin veden lämpötila kohosi $8,0 \rightarrow 18,7^{\circ}\text{C}$. Kalojen aktiivisuudesta ei havaittu muutoksia. Sen sijaan hengitysfrekvenssit kasvoivat huomattavasti lämpötilan noustessa. Hengityksen kiihtyminen oli suurinta lämpötilan noustessa $12,0 \rightarrow 17,0^{\circ}\text{C}$, jolloin hengitysfrekvenssit suurenivat keskimäärin 50 %. Nopeasti kohoava lämpötila voi suurentaa hengitysfrekvenssejä jopa enemmän kuin letaali myrkkypitoisuus. Siten lämpötilan pitäminen vakiona on toksisuustesteissä hyvin tärkeää.

Kalojen koealtaan takaosassa saaman sähköiskun voimakkuus riippuu koeveden sähkönjohtavuudesta. Laitteistossa ei ole mahdollista säätää elektrodien välistä jännitettä veden sähkönjohtavuuden mukaan siten, että sähköiskun voimakkuus olisi vakio. Koska kala on tarkoitus opettaa välttämään altaan takaosaan menoa, sähköiskun on oltava riittävän voimakas. Kun veteen lisätään esim. jotakin metallisuolaa, veden sähkönjohtavuus kasvaa ja kala kenties välttää sähkökenttään joutumista enemmän kuin puhtaassa vedessä. Koealtaan veden sähkönjohtavuutta suurennettiin kaloille haitattomilla natriumkloridilisäyksillä. Pitoisuus 100 mg l^{-1} NaCl nosti sähkönjohtavuuden $24,0 \rightarrow 36,0\text{ mSm}^{-1}$. Toisella lisäyksellä suurennettiin NaCl-pitoisuus arvoon 500 mg l^{-1} , jolloin sähkönjohtavuus nousi arvoon $112,0\text{ mSm}^{-1}$. Sähkönjohtavuuden kasvu ei vaikuttanut kalojen "oppimiskykyyn" - jo ennen koetta sähkökentässä viihtynyt kala makasi edelleen sähkökentässä. Sähkökentän voimakkuuden suurentaminen ei ollut tässä vaiheessa mahdollista.

Koska suurin kokeissa käytetty metallisuolapitoisuus suurensi sähkönjohtavuutta vain 2,5 yksikköä, sähkönjohtavuuden kasvulla tuskin oli merkitystä kalojen käyttäytymiseen koeaikana.

SPRAGUEn (1973) mukaan koekaloja on sopeutettava laimennusveteen ja koelämpötilaan vähintään kaksi viikkoa. Muuta kuin kuolleisuutta tutkivissa kokeissa kalojen on lisäksi annettava tottua koealtaassa koejärjestelyihin mahdollisuuksien ja tarpeen mukaan. Koska tässä työssä tutkittiin kalojen aktiivisuutta ja hengitysfrekvenssejä, oli kalojen oltava täysin rauhoittuneita ennen mittausten aloittamista. Kun koekalat siirrettiin varastointialtaasta koealtaaseen, ne olivat aluksi hyvin levottomia ja hengittivät kiivaasti, mutta rauhoittuivat vähitellen. Kalojen sopeutumista tutkittiin vertaamalla yhden ja kahden vuorokauden sopeutusajan jälkeen mitattuja keskimääräisiä hengitysfrekvenssejä. Kahdenkymmenen havainnon aineistolle tehty t-testi ei osoittanut merkitsevää eroa. KIWAn (1977) ohjeiden mukaan kala käyttäytyy vastaaventyyppisissä koealtaissa normaalisti viimeistään vuorokauden kuluttua siirtämisestä.

Koelaitteistolla on tarkoitus havaita äkilliset, kaloille haitalliset veden laadun muutokset. Ennen kokeita selvitettiin, havaitsevatko ja reagoivatko kalat äkillisiin, haitattomiin veden laadun muutoksiin. Altaaseen syötettiin voimakasta RhodaminB-vesiliuosta. Kalat eivät reagoineet millään tavalla. Myöskään äkillinen CaSO_4 -lisäys (150 mg l^{-1}) ei vaikuttanut kalojen aktiivisuuteen eikä hengitysfrekvensseihin.

4.35 S i n k k i k o k e e t

Kalojen reagoimista eri suuruisiin sinkkipitoisuuksiin tutkittiin 11 kokeessa, joissa käytetyt pitoisuudet vaihtelivat $0,1 - 10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Lähtöpitoisuudeksi valittiin $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, jonka on todettu selvästi muuttavan koekalojen aktiivisuutta valovastusmittaukseen perustuvissa toksisuus testeissä (WALLER ja CAIRNS 1972). Muut kokeissa käytetyt sinkkipitoisuudet valittiin niin, että saa-

tiin selville pienimmät sinkkipitoisuudet, jotka muuttavat koekalojen aktiivisuutta tai hengitysfrekvenssejä siten, että syntyy hälytyshavainto. Kun hälytyshavainnon aiheuttavat pienimmät pitoisuudet löydettiin, kokeet toistettiin tulosten varmistamiseksi.

Kahden tunnin koeajan jälkeen joitakin myrkkypitoisuuksia kaksin-, kolmin- tai kymmenkertaistettiin ja seurattiin myrkylle alttiina olleiden kalojen reagoimista äkkiä moninkertaistettuun myrkkypitoisuuteen.

Pitkäaikaisen, subletaalille sinkkipitoisuudelle altistamisen vaikutusta kalojen reagointikyvyn säilymiseen tutkittiin altistamalla kaloja noin kolme viikkoa pitoisuudelle $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, minkä jälkeen pitoisuus nostettiin 10- ja noin 33-kertaiseksi.

Kalojen reagoimisvoimakkuuden ja sinkkipitoisuuden välisen yhteyden selvittämiseksi tehtiin lisäksi koe reagoimiskynnyksiä suuremmalla sinkkipitoisuudella ($10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$).

Mikäli kalat näyttivät jonkin kokeen jälkeen huonokuntoisilta, seurattiin niiden hengissä säilymistä vielä parin tunnin ajan.

4.36 K u p a r i k o k e e t

Kuparin aiheuttamia reaktioita seurattiin 9 kokeessa käyttäen Cu^{2+} -pitoisuuksia $0,1 - 5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. C.L.M. Poels (kirjeell. tied. 20.3.1978) ilmoittaa kalojen hälyttäneen pitoisuuden $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ kahden ja puolen tunnin koeajan jälkeen, minkä perusteella ensimmäisessä kokeessa käytettiin pitoisuutta $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Eri pitoisuuksia käyttäen pyrittiin saamaan selville pienimmät hälytyshavainnon aiheuttavat kuparipitoisuudet. Tärkeimmät kokeet toistettiin.

Kalojen reagoimiskykyä tutkittiin myös kaksin- tai kolminkertaistamalla myrkkyyntö kahden tunnin koeajan jälkeen.

Lyhytaikaisen altistuksen vaikutusta kalojen reagointikykyyn tutkittiin pitämällä kaloja kahden tunnin koeajan jälkeen noin vuoro-

kausi puhtaassa vedessä, minkä jälkeen veteen syötettiin joko alkuperäinen tai sitä 2-3 kertaa suurempi kuparipitoisuus. Eri kuparipitoisuuksien aiheuttamien kalojen reagoimisvoimakkuuksien vertailemiseksi tehtiin yksi koe pitoisuudella $5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$.

Mikäli kalat näyttivät jonkin kokeen jälkeen huonokuntoisilta, seurattiin niiden hengissä säilymistä vielä parin tunnin ajan.

5. T U L O K S E T

5.1 LAITTEISTON TOIMIVUUS

Koelaitteisto oli toiminnassa 75 vuorokautena yhteensä noin 1616 tuntia. Erilaisia toimintahäiriöitä oli yhteensä 66 kappaletta 36 vuorokautena. Siten häiriövuorokausina laskettu häiriöprosentti oli 48. Toimintahäiriöiksi on katsottu sellaiset laitteistossa ilmenneet viat, jotka olisivat käytännön valvontatilanteessa voineet johtaa väärän hälytyksen syntymiseen tai veden laadun äkillisen muuttumisen havaitsematta jäämiseen.

Yleisin havaittu häiriö oli anturin toiminnan keskeytyminen (50 häiriötä 32 vuorokautena). Kokeita tehtäessä viat havaittiin välittömästi ja voitiin yleensä korjata säätämällä vastuksia. Keskimmäisen altaan taka-anturi lopetti toimintansa 19.7., ja koska vikaa ei saatu korjatuksi, tätä pitkäaikaista häiriötä ei otettu huomioon toimintahäiriölaskelmissa.

Toinen häiriöryhmä oli ylimääräisten pulssien syntyminen (10 häiriötä 4 vuorokautena). Ajoittain taka-anturit antoivat jopa 500 pulssia 15 minuutin laskentajakson aikana valonsäteen katkeamatta kertaakaan. Yleensä ylimääräisiä pulsseja syntyi 1-5 15 minuutin aikana ja useammin taka- kuin etuantureihin. Keskimmäisen altaan etuanturin laskuri jäi ajoittain numeron puoliväliin - myöhemmin havaittiin vian johtuneen anturin toiminnasta.

Ylimääräisten pulssien syntyminen voitiin havaita piirturin avulla: itsekseen laskureille syntyneet pulssit eivät piirtyneet paperille.

Muuten piirturista ei ollut kokeissa hyötyä, koska piirturipaperin nopeus oli liian pieni, jotta paperilta olisi voitu laskea yksittäisiä pulsseja. Piirturissa ilmeni jatkuvasti pieniä häiriöitä, joita ei laskettu varsinaisiksi toimintahäiriöiksi. Piirturi oli huollossa ennen kokeita, mutta vikoja ei saatu korjatuksi. Toimintahäiriöiksi ei luettu myöskään lamppujen sammumisen aiheuttama antureiden toiminnan keskeytymistä - jo yhden lampun sammuminen keskeytti anturin toiminnan. Lamppujen kesto aika vaihteli 74:stä 1290:een tuntiin ($\bar{x} = 747 \pm 58$). Etuantureiden lamput paloivat keskimäärin 564 ± 30 tuntia, taka-antureiden lamput 929 ± 57 tuntia. Ykkösaltaan antureiden lamput paloivat keskimäärin kaksi kertaa niin kauan kuin kolmosaltaan antureiden lamput. Kun joku anturin neljästä lampusta vaihdettiin, paloivat usein myös viereiset lamput.

5.2 KOKEET

Koska kokeet olivat lyhytaikaisia, ei taka-antureiden pulssimäärillä ollut merkitystä, etenkin kun hälytysjärjestelmä ei ollut toiminnassa. Tuloksissa on siten esitetty selvyuden vuoksi vain etuantureiden pulssimäärät.

Pulssimäärät mitattiin normaalioloissa 15 minuutin välein ja hengitysfrekvenssit 30 minuutin välein viiden tunnin ajan. Normaalioloissa mitattujen suureiden maksimi arvot on rengastettu tulostaulukoissa.

Seuraavassa esitetään tulokset kokeittain ja selvitetään kokeiden kulkua. Kokeet on numeroitu aikajärjestyksessä 1 - 20.

5.21 S i n k k i k o k e e t: k o k e e t 1-7, 15-18

Kokeessa 1 koealtaan veden sinkkipitoisuus nostettiin arvoon $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ noin kahdessa minuutissa, minkä jälkeen sinkkipitoisuus pidettiin vakiona kahden tunnin ajan. Kahden tunnin koeajan jälkeen sinkkipitoisuus kaksinkertaistettiin. Kalojen reagoimista

seurattiin tunnin ajan, minkä jälkeen veden Zn^{2+} -pitoisuus suurennettiin arvoon $9,0 \text{ mg l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$. Kalojen aktiivisuutta ja hengitysfrekvenssejä seurattiin vielä tunnin ajan. Tulokset ovat liitteessä 3.

Koeveden lämpötila oli $11,8^{\circ}\text{C}$ ja pH ensimmäisen sinkkilisäyksen jälkeen 7,4.

Kalat tulivat silminnähden levottomiksi heti myrkyn lisäyksen jälkeen. Levottomuutta kesti noin puoli tuntia, minkä jälkeen kalat pysyttelivät paikoillaan altaan etuosassa kokeen loppuajan. Alkupitoisuuden kaksin- tai kolminkertaistamisella ei ollut vaikutusta kalojen aktiivisuuteen: kalat pysyttelivät paikoillaan altaan etuosassa.

Kalojen hengitys kiihtyi heti sinkkilisäyksen jälkeen, mutta hidastui vähitellen koetta edeltävälle tasolle. Sinkkipitoisuuden kaksinkertaistaminen aiheutti hengityksen kiihtymistä, mutta pitoisuuden nosto arvoon $9,0 \text{ mg l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ suurensi vain yhden kalan hengitysfrekvenssiä (kuva 6).

Koska kalat reagoivat kokeessa 1 melko selvästi pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$, kokeessa 2 kokeiltiin pienempää sinkkipitoisuutta. Kokeessa seurattiin ensin kalojen reagoimista pitoisuuteen $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ kahden tunnin ajan. Sitten sinkkipitoisuus suurennettiin kaksin- ja kolminkertaiseksi - selvitettiin, reagoivatko kalat myrkkypitoisuuden moninkertaistamiseen. Tulokset ovat liitteessä 4.

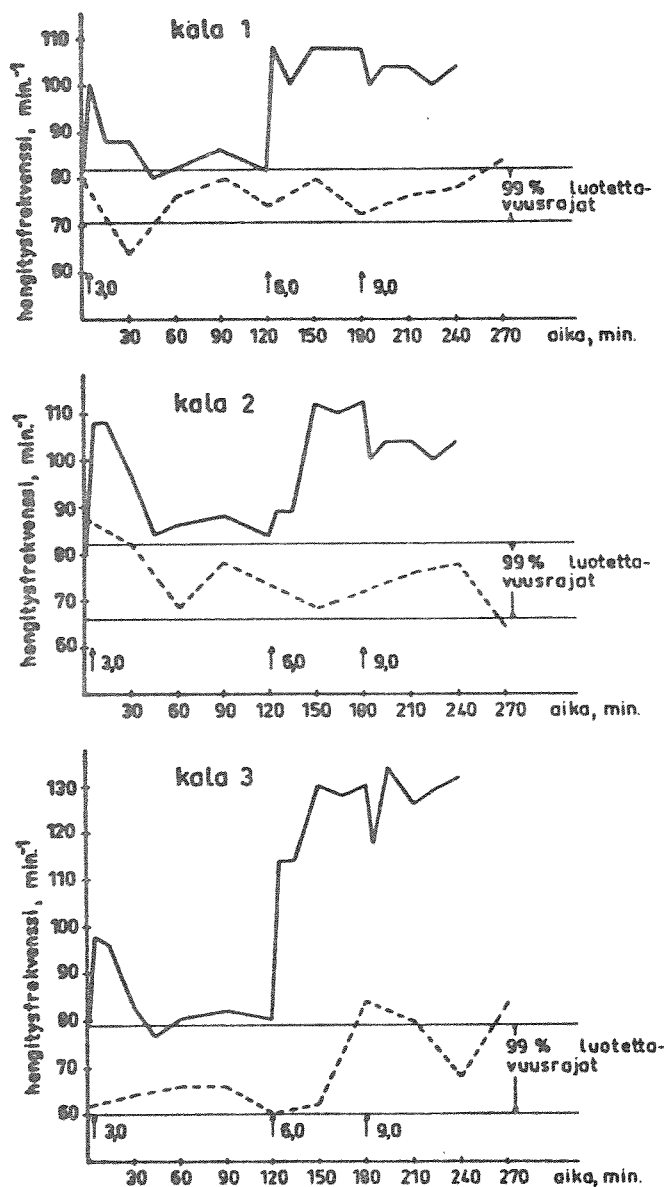
Koeveden lämpötila oli $11,5^{\circ}\text{C}$ ja pH ensimmäisen sinkkilisäyksen jälkeen 7,6.

Kalat tulivat levottomiksi välittömästi sinkkilisäyksen jälkeen. Levottomuutta kesti noin puoli tuntia - yksi kaloista oli rauhaton kokeen koko kestoajan. Sinkkipitoisuuden kaksin- ja kolminkertaistaminen aiheutti silmin havaittavaa levottomuutta.

Hengitysfrekvenssit suurenivat kokeen alussa, mutta palautuivat vähitellen normaaleiksi. Sinkkipitoisuuden suurentaminen arvoon 1,0 ja $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ aiheutti hengityksen väliaikaista kiihtymistä (kuva 7).

Kokeella 3 haluttiin selvittää, suurentavatko pitoisuutta $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ pienemmät sinkkipitoisuudet kalojen hengitysfrekvenssejä ja reagoivatko kalat myrkkypitoisuuden moninkertaistamiseen. Koe aloitettiin nostamalla veden sinkkipitoisuus arvoon $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Kahden tunnin koeajan jälkeen sinkkipitoisuus suurennettiin tunnin välein $0,2 \rightarrow 0,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja edelleen arvoon $4,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Tulokset ovat liitteessä 5.

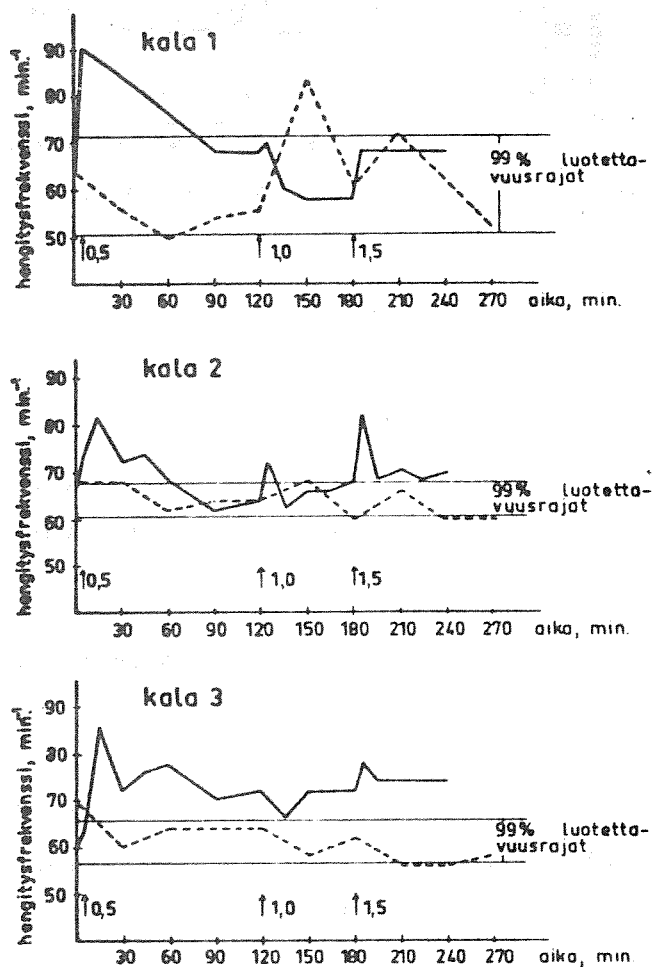
Koeveden lämpötila oli $11,5^{\circ}\text{C}$ ja pH ensimmäisen sinkkilisäyksen jälkeen 7,7.



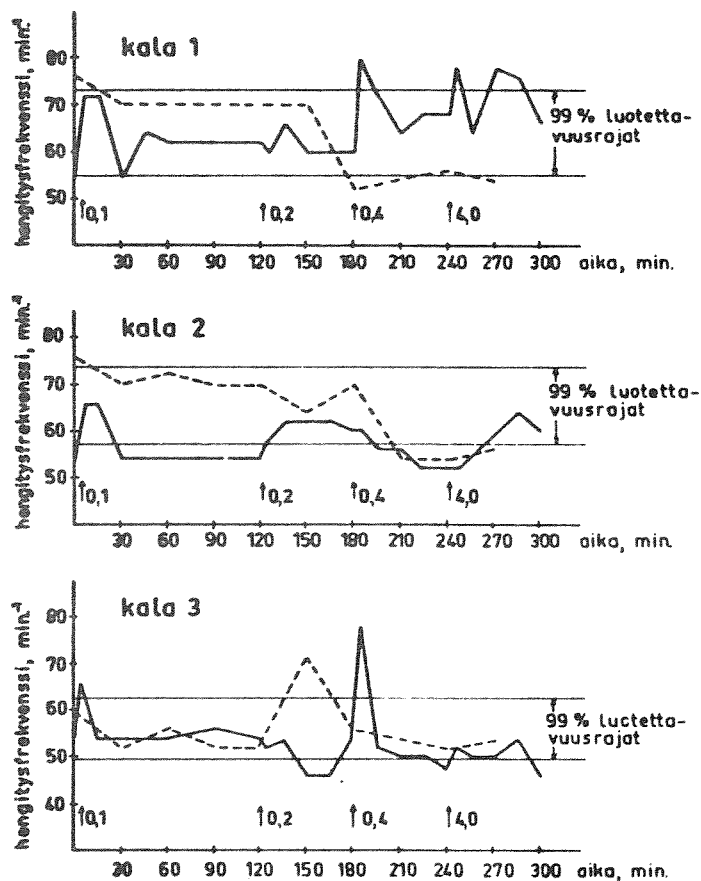
Kuva 6. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 1 aikana. ↑ = Zn^{2+} -pitoisuuden suurentaminen.

Kalat tulivat hieman levottomiksi, kun veden laatu muuttui yht'äkkiä. Jo 15 minuutin kuluttua kalat käyttäytyivät täysin normaalisti. Sinkkipitoisuuden suurentaminen $0,2 \rightarrow 0,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ aiheutti jonkin verran levottomuutta kaloissa. Pitoisuuden kymmenkertaistaminen arvoon $4,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ teki yhden kalan levottomaksi.

Kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat hieman hetkellisesti kokeen alussa. Sinkkipitoisuuden kaksinkertaistaminen ei vaikuttanut hengitysfrekvensseihin, mutta pitoisuuden nosto arvoon $0,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ aiheutti kahden kalan hengityksen kiihtymisen. Sinkkipitoisuuden kymmenkertaistaminen arvoon $4,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ suurensi vain yhden kalan hengitysfrekvenssiä (kuva 8).



Kuva 7. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 2 aikana. $\uparrow = \text{Zn}^{2+}$ -pitoisuuden suurentaminen.



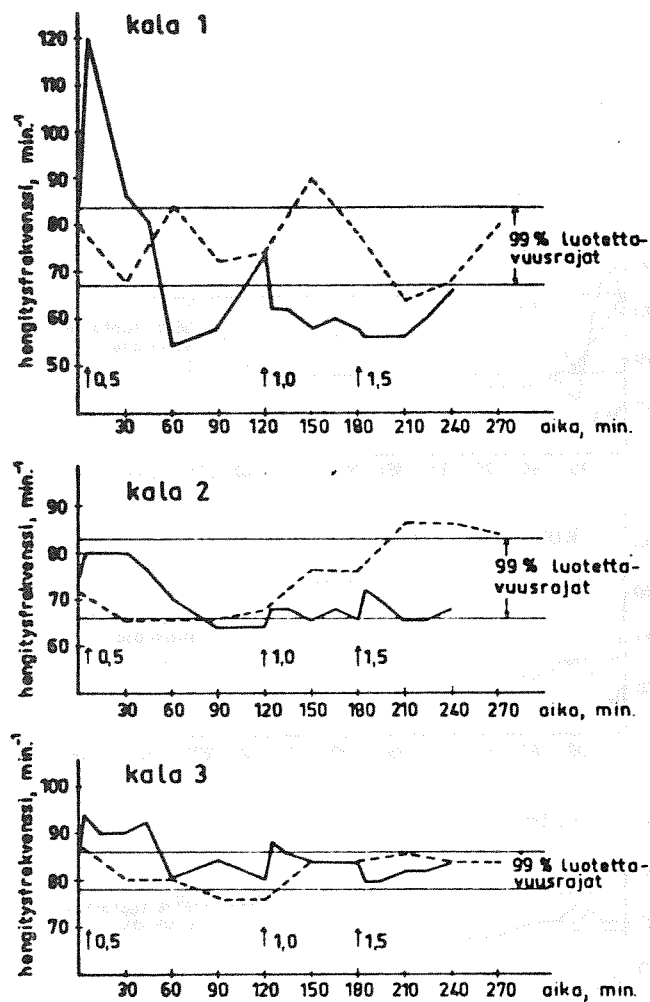
Kuva 8. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 3 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Koe 4 oli kokeen 2 toistokoe - haluttiin tarkistaa, aiheuttaako 0,5 mg l⁻¹ Zn²⁺ kalojen hengitysfrekvenssien kasvua. Tulokset ovat liitteessä 6.

Koeveden lämpötila oli 12,0 °C ja pH ensimmäisen sinkkilisäyksen jälkeen 7,8.

Kalat tulivat selvästi levottomiksi heti sinkkilisäyksen jälkeen, mutta rauhoittuivat vähitellen. Kahdessa kalassa oli havaittavissa levottomuutta myös sinkkipitoisuuden kaksin- ja kolminkertaistamisen jälkeen.

Kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat heti kokkeen alettua ja palautuivat vähitellen normaaleiksi. Sinkkipitoisuuden suurentaminen ei aiheuttanut hengityksen merkittävää kiihtymistä (kuva 9).



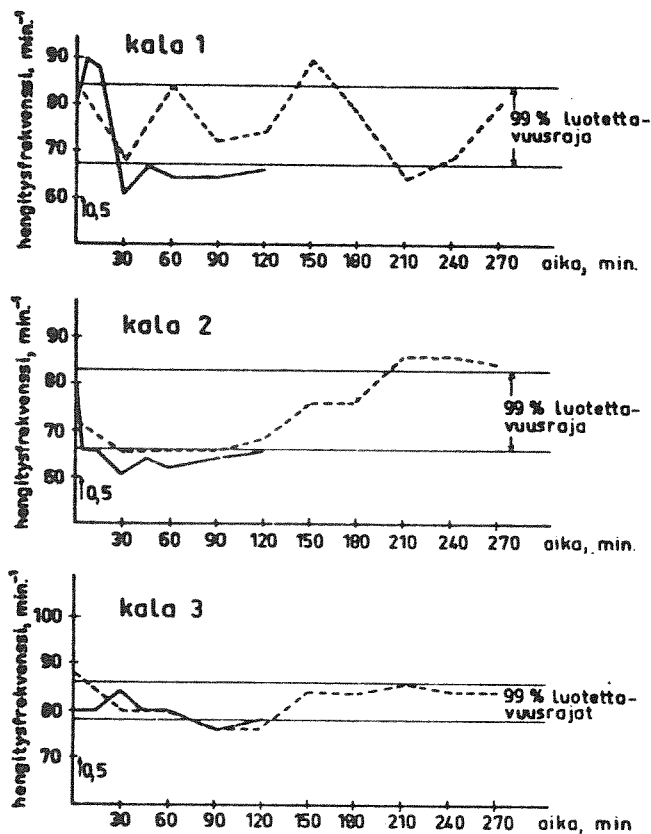
Kuva 9. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 4 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Kokeen 4 jälkeen kalojen annettiin olla puhtaassa vedessä seuraavaan päivään (n. 16 tuntia), minkä jälkeen toistettiin koe pitoisuudella 0,5 mg l⁻¹ Zn²⁺ (koe 5). Haluttiin selvittää, vaikuttaako altistus melko suurelle sinkkipitoisuudelle kalan reagointikykyyn, jos kala saa välillä toipua puhtaassa vedessä. Vertailuarvoina käytettiin koetta 4 varten normaalioloissa mitattuja pulssimääriä ja hengitysfrekvenssejä. Tulokset ovat liitteessä 7.

Koeveden lämpötila oli 12,1 °C ja pH 7,8.

Kaloissa havaittiin levottomuutta ensimmäisen 15 minuutin aikana.

Sinkkilisäys suurensi väliaikaisesti vain yhden kalan hengitysfrekvenssiä (kuva 10).



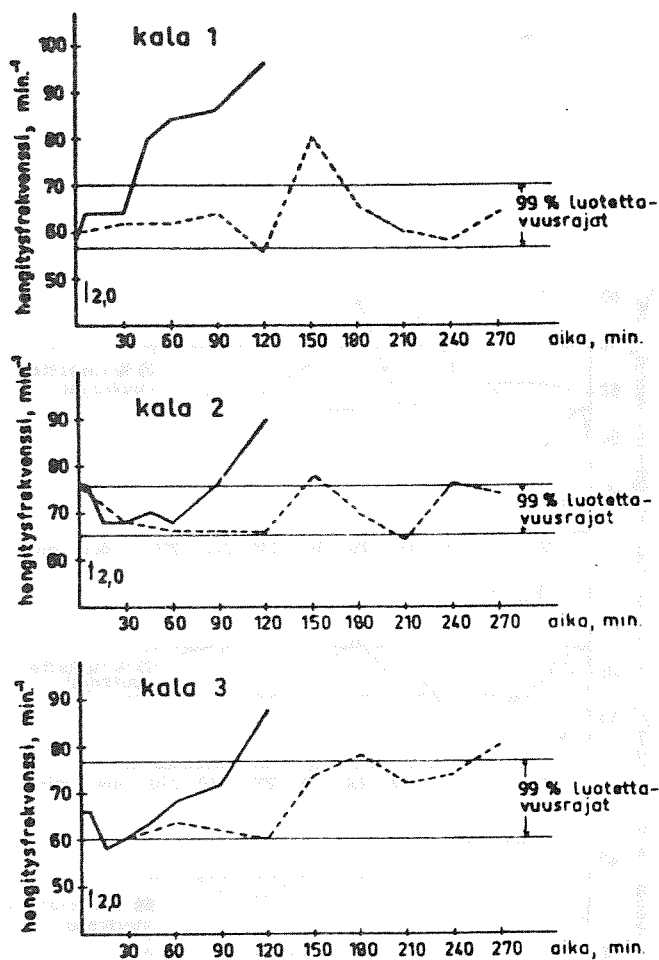
Kuva 10. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 5 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Koska kalat reagoivat pulssimäärien perusteella pitoisuuteen 3,0 mg l⁻¹ Zn²⁺ ja hengitysfrekvenssien perusteella pitoisuuteen 0,5 mg l⁻¹ Zn²⁺, kokeessa 6 tutkittiin yhden välillä olevan pitoisuuden vaikutuksia. Kokeessa seurattiin kalojen reagoimista pitoisuuteen 2,0 mg l⁻¹ Zn²⁺. Tulokset ovat liitteessä 8.

Koeveden lämpötila oli 13,8 °C ja pH 7,7.

Kalat olivat levottomia ensimmäisen 15 minuutin havaintojakson aikana ja ajoittain myös muulloin kokeen aikana.

Hengitysfrekvenssit suurenivat vähitellen kokeen aikana (kuva 11).



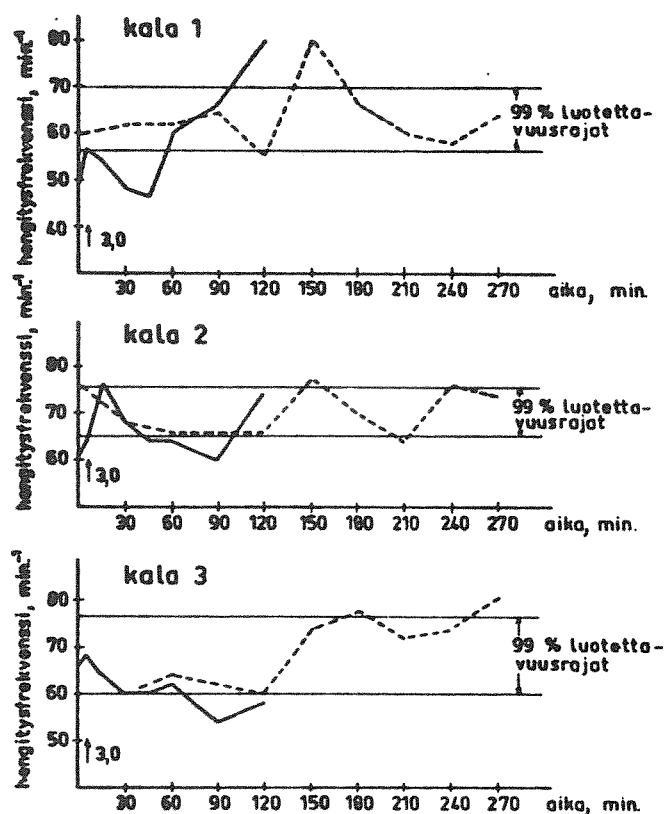
Kuva 11. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 6 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Kokeen 6 jälkeen kalojen annettiin olla puhtaassa vedessä noin 1,5 vuorokautta (n. 40 tuntia), minkä jälkeen kalat altistettiin kokeessa 7 pitoisuudelle 3,0 mg l⁻¹ Zn²⁺. Seurattiin aiemman sinkkialtistuksen vaikutusta reagointikykyyn. Vertailuarvoina käytettiin koetta 6 varten normaalioloissa mitattuja pulssimääriä ja hengitysfrekvenssejä. Tulokset ovat liitteessä 9.

Koeveden lämpötila oli 13,8 °C ja pH 7,7.

Kalat havaitsivat äkillisen veden laadun muutoksen ja olivat hieman levottomia ensimmäisen 15 minuutin laskentajakson aikana ja aivan kokeen lopussa.

Hengitysfrekvenssit eivät suurentuneet merkittävästi kokeen aikana (kuva 12).



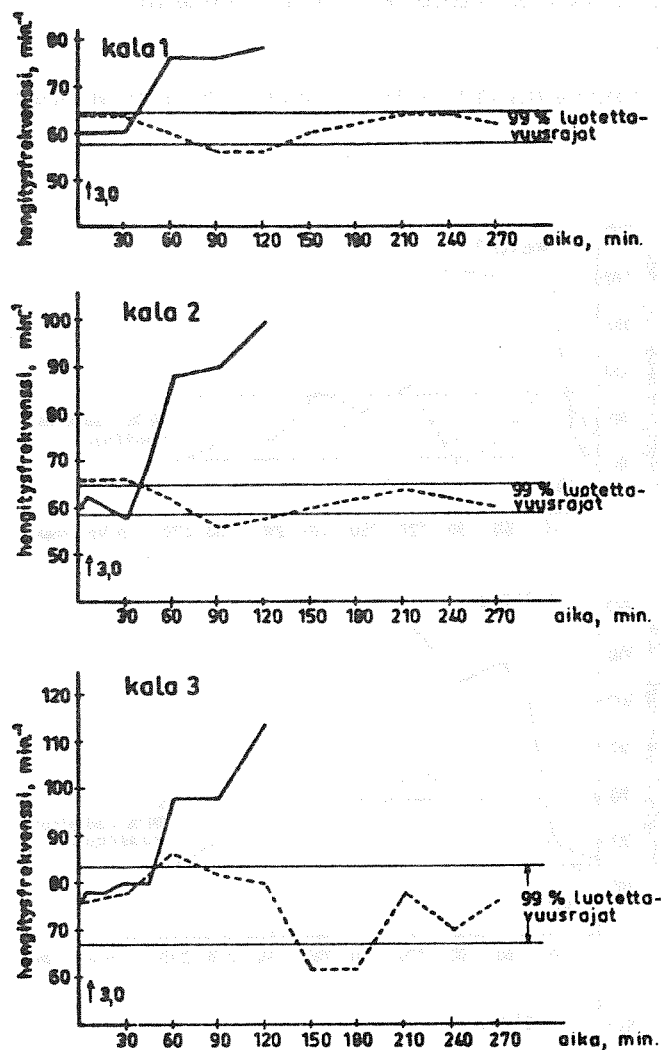
Kuva 12. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 7 aikana. ↑ = Zn^{2+} -pitoisuuden suurentaminen.

Koe 15 oli kokeen 1 toistokoe: haluttiin varmistaa, reagoivatko kalat pulssimäärien perusteella pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Samalla saatiin vertailuaineistoa pitkäaikaisaltistuksen jälkeen tehtävää sinkkikoetta varten (koe 17). Tulokset ovat liitteessä 10.

Koeveden lämpötila oli $18,5^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,7.

Kalat havaitsivat sinkin välittömästi ja tulivat levottomiksi. Levottomuutta kesti koko kokeen ajan.

Hengitysfrekvenssit suurenivat vähitellen kokeen aikana (kuva 13).



Kuva 13. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 15 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

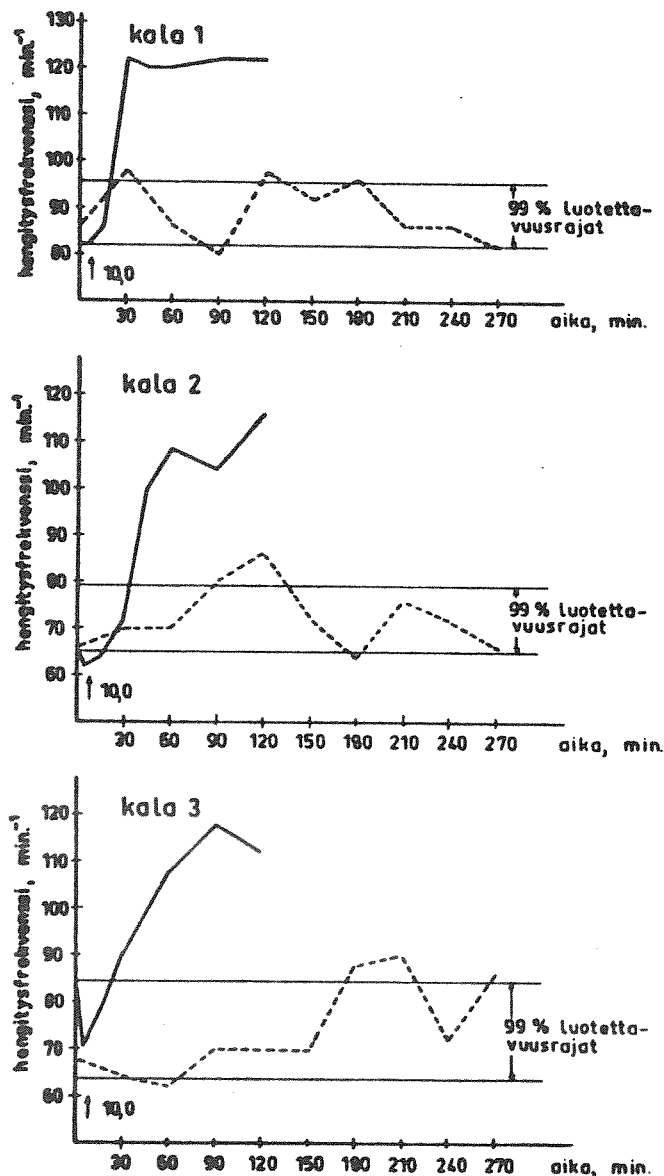
Kokeessa 16 kalat altistettiin pitoisuudelle 10,0 mg l⁻¹ Zn²⁺, jotta saataisiin tietoa kalojen reaktioiden voimakkuuksista erilaisille sinkkipitoisuuksille. Samalla saatiin vertailuaineistoa pitkäaikaisaltistuksen jälkeen tehtävää sinkkikoetta varten (koe 8). Tulokset ovat liitteessä 11.

Koeveden lämpötila oli 18,3 °C ja pH 7,4.

Kalat havaitsivat sinkin välittömästi, mutta rauhoittuivat noin puolessa tunnissa. Vajaan tunnin paikoillaan olon jälkeen kalat tulivat taas levottomiksi. Kala 1 kuoli noin tunnin kuluttua kokeen päättymisestä. Kuolemaa edelsi kuolinkamppailu. Kuoleva ka-

la ajautui virran mukana taka-anturin luokse.

Kalojen hengitysfrekvenssit kasvoivat kokeen aikana vähitellen (kuva 14).



Kuva 14. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 16 aikana. ↑ = Zn²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

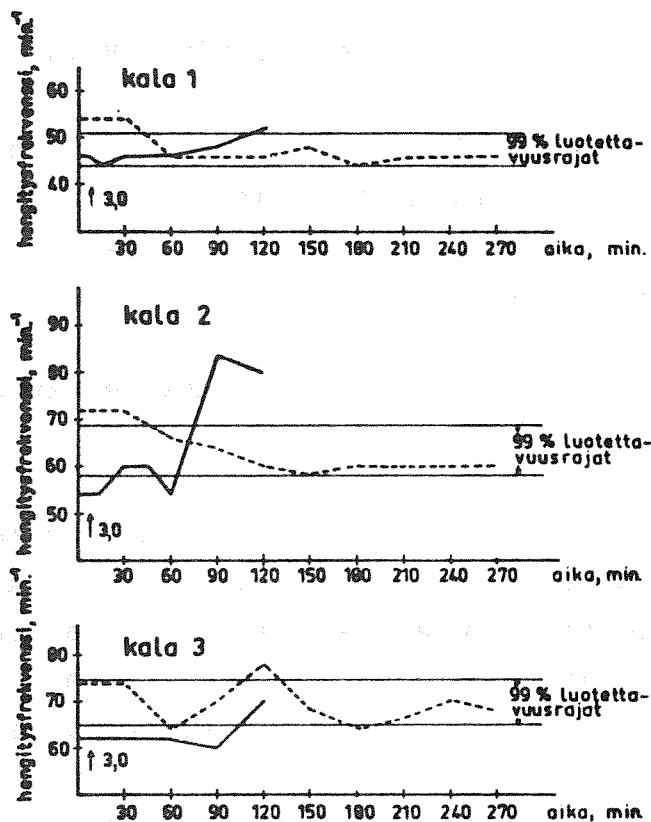
Kokeessa 17 kaloja altistettiin pitoisuudelle 0,3 mg l⁻¹ Zn²⁺ 18 vuorokauden ajan ennen koetta. Kalat söivät altistusaltaassa aluksi halukkaasti, mutta ruokahalu pieneni havaittavasti altistusajan pidentessä. Sinkkipitoisuus altistusaltaassa vaihteli lasketun pitoisuu-

den molemmin puolin ($0,2 - 0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$), mikä johtui vesi- ja myrkynsyöttöjärjestelyissä sattuneista häiriöistä. Kokeessa kalat altistettiin pitoisuudelle $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Kokeella haluttiin selvittää, vaikuttaako pitkäaikainen altistus melko pienessä sinkkipitoisuudessa kalojen kykyyn reagoida noin kymmenkertaiseen sinkkipitoisuuteen. Tulokset ovat liitteessä 12.

Koeveden lämpötila oli $18,3^\circ\text{C}$ ja pH 7,7.

Kalat tulivat heti silmin nähden levottomiksi, mutta rauhoittuivat jo 15 minuutin kuluttua. Kalat näyttivät kokeen loppuaikana olevan rauhallisia, joskin ne liikkuivat altaan taka-aosassa ehkä normaalia useammin.

Vain yhden kalan hengitysfrekvenssi suureni selvästi kokeen aikana (kuva 15).



Kuva 15. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 17 aikana. ↑ = Zn^{2+} -pitoisuuden suurentaminen.

Kokeessa 18 kaloja altistettiin ennen koetta pitoisuudelle $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 20 vuorokauden ajan, minkä jälkeen koeveden sinkkipitoisuus nostettiin arvoon $10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Kalojen ruokahalu heikkeni altistuksen aikana - loppuvaiheessa vain yksi kaloista söi. Sinkkipitoisuus vaihteli altistuksen aikana $0,2 - 0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Kokeella haluttiin selvittää pitkäaikaisen sinkkialtistuksen vaikutusta kalojen reagoimiskykyyn. Tulokset ovat liitteessä 13.

Koeveden lämpötila oli $18,5^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,5.

Kaikki kalat tulivat heti levottomiksi, mutta yksi kaloista ei käynyt yhtään kertaa altaan takaosassa.

Hengitysfrekvenssit suurenivat vähitellen ja hengitys oli jo tunnin kuluttua huomattavasti normaalia kiivaampaa. Yhden kalan hengitys hidastui ennen kokeen loppumista (kuva 16).

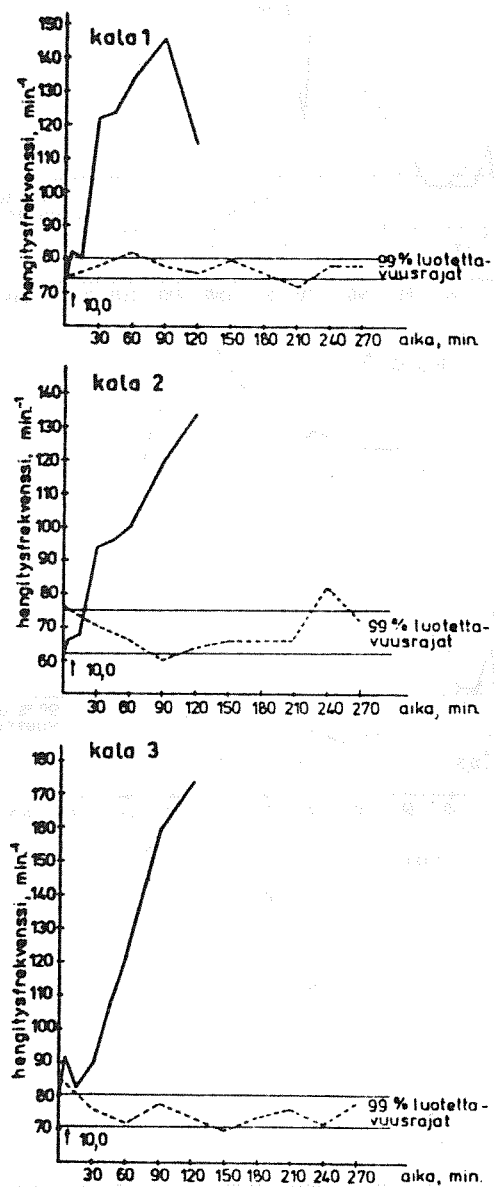
5.22 K u p a r i k o k e e t: k o k e e t 8-14, 19-20

Koe 8 aloitettiin pitoisuudella $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Kahden tunnin kuluttua pitoisuus kaksinkertaistettiin arvoon $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ja tunnin kuluttua pitoisuus suurennettiin arvoon $10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Tulokset ovat liitteessä 14.

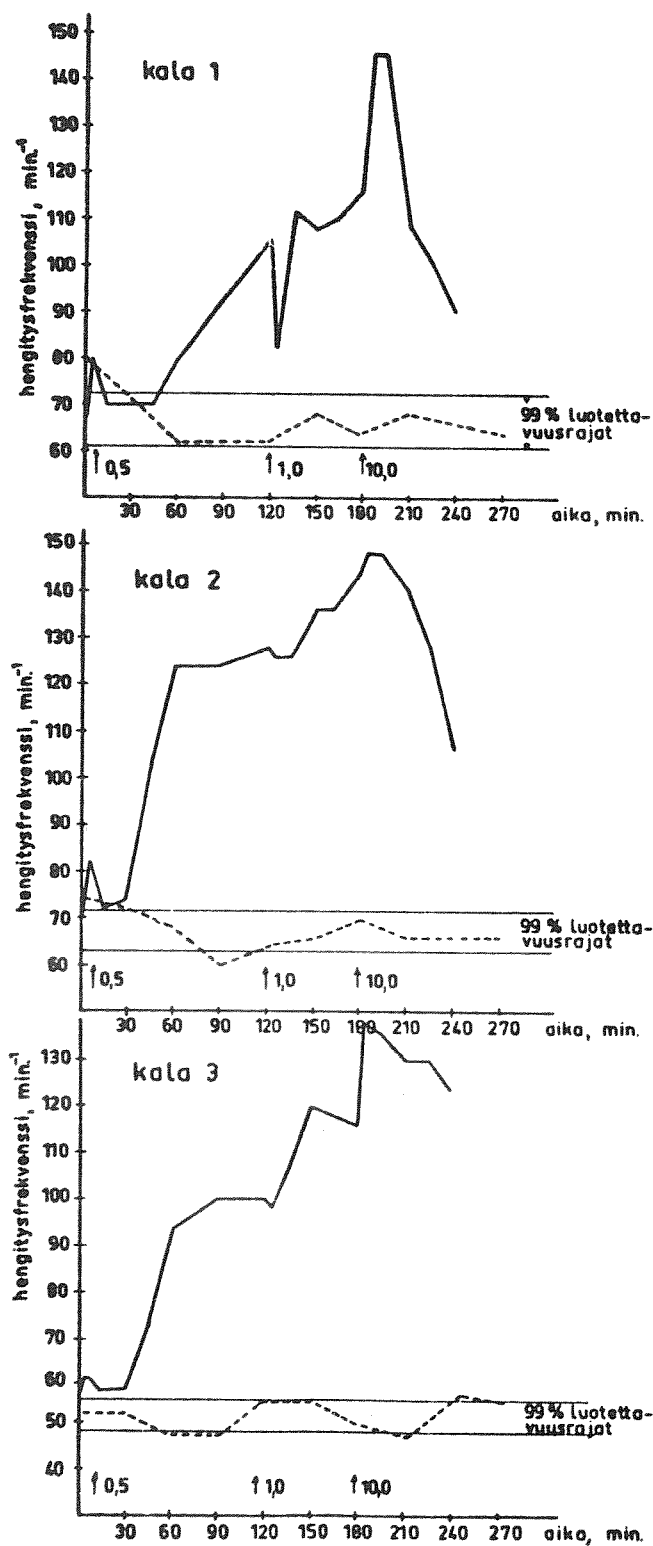
Koeveden lämpötila oli $17,5^{\circ}\text{C}$ ja pH ensimmäisen kuparilisäyksen jälkeen 7,9.

Kalat tulivat alussa hieman levottomiksi. Kuparipitoisuuden kaksinkertaistaminen aiheutti levottomuutta vain yhdessä kalassa. Kuparipitoisuuden kymmenkertaistaminen teki kaikki kalat rauhattomiksi. Kokeen lopussa kalat ajautuivat altaan perälle taka-antureiden luokse ja kuolivat noin 10 minuutin kuluessa kokeen lopettamisen jälkeen.

Kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat vähitellen pitoisuuden $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ vaikutuksesta. Pitoisuuden kaksin- ja kymmenkertaistaminen aiheutti edelleen hengityksen kiihtymistä. Hengitysfrekvensseissä oli havaittavissa pienenemistä ennen kalojen kuolemaa (kuva 17).



Kuva 16. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkovii-
va) ja kokeen 18 aikana. ↑ = Zn²⁺ -pitoisuuden suuren-
taminen.



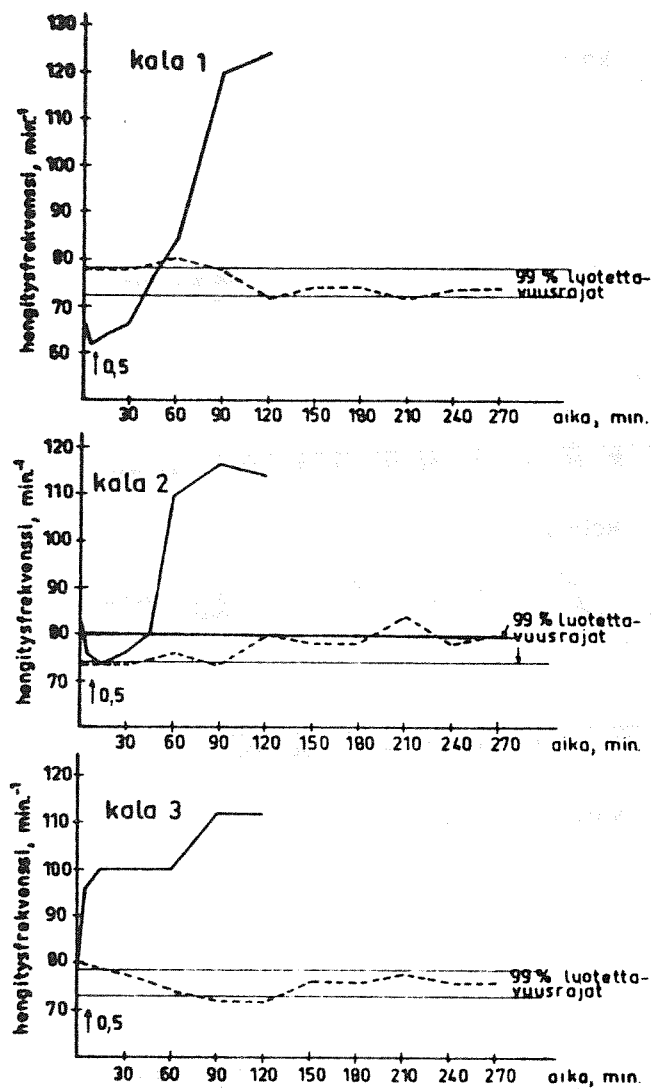
Kuva 17. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 8 aikana. = Cu²⁺ -pitoisuuden suurentaminen.

Koe 9 oli kokeen 8 toistokoe: kalat altistettiin pitoisuudelle $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Kokeessa 8 kalat olivat normaalioloissakin levottomia, joten koe oli syytä toistaa. Kokeen jälkeen veden annettiin vaihtua vähitellen puhtaaksi. Tulokset ovat liitteessä 15.

Koeveden lämpötila oli $17,5^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,9.

Yksi kaloista tuli välittömästi hieman levottomaksi, mutta toiset kalat eivät näyttäneet havaitsevan äkillistä kuparilisäystä.

Hengitysfrekvenssit kasvoivat vähitellen kokeen aikana (kuva 18).



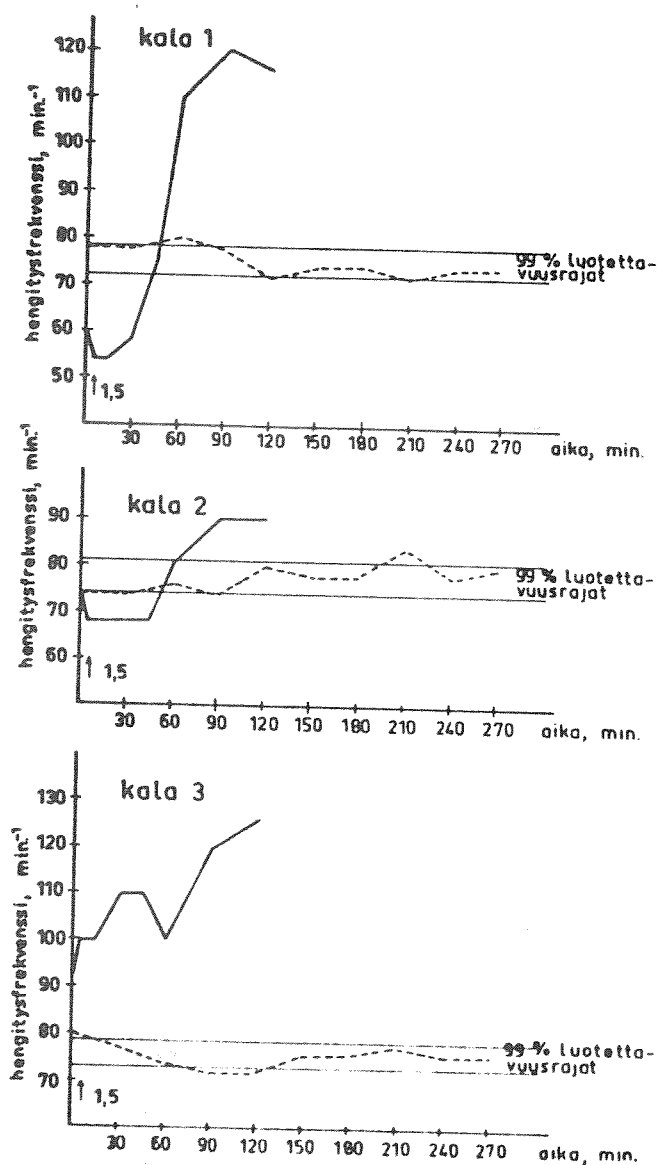
Kuva 18. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 9 aikana. $\uparrow = \text{Cu}^{2+}$ -pitoisuuden suurentaminen.

Kalojen annettiin olla kokeen 9 jälkeen puhtaassa vedessä noin 1 1/2 vuorokauden ajan, minkä jälkeen kalat altistettiin kokeessa 10 pitoisuudelle $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Kokeella haluttiin selvittää, toipuvatko kalat ja kykenevätkö ne siten havaitsemaan uudeleen kuparin läsnäolon. Tulokset ovat liitteessä 16.

Koeveden lämpötila oli $17,7^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,8.

Kalat tulivat hieman levottomiksi kokeen alussa. Kaksi kaloista rauhoittui täysin tunnin kuluessa ja pysyi sitten paikoillaan kokeen loppuajan.

Hengitysfrekvenssit kasvoivat vähitellen kokeen aikana (kuva 19).



Kuva 19. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 10 aikana. $\uparrow = \text{Cu}^{2+}$ -pitoisuuden suurentaminen.

Kokeessa 11 kalat altistettiin pitoisuudelle $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Tulokset ovat liitteessä 17.

Koeveden lämpötila oli $17,8^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,8.

Kaksi kaloista tuli välittömästi levottomiksi ja levottomuutta jatkui kokeen loppuun saakka. Yksi kaloista kuoli noin tunnin kuluttua kokeen lopettamisesta - kala ei käyttäytynyt levottomasti ennen kuolemaansa. Kuollut kala ajautui taka-anturin luokse.

Kaikkien kalojen hengitysfrekvenssit kasvoivat kokeen aikana vähitellen. Yhden kalan hengitys hidastui kokeen lopussa (kuva 20).

Kokeen 11 jälkeen hengissä säilyneiden kahden kalan annettiin olla puhtaassa vedessä noin 16 tuntia, minkä jälkeen kalat altistettiin kokeessa 12 pitoisuudelle $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Tulokset ovat liitteessä 18.

Koeveden lämpötila oli $18,0^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,7.

Kaloissa ei ollut havaittavissa normaalista poikkeavaa levottomuutta.

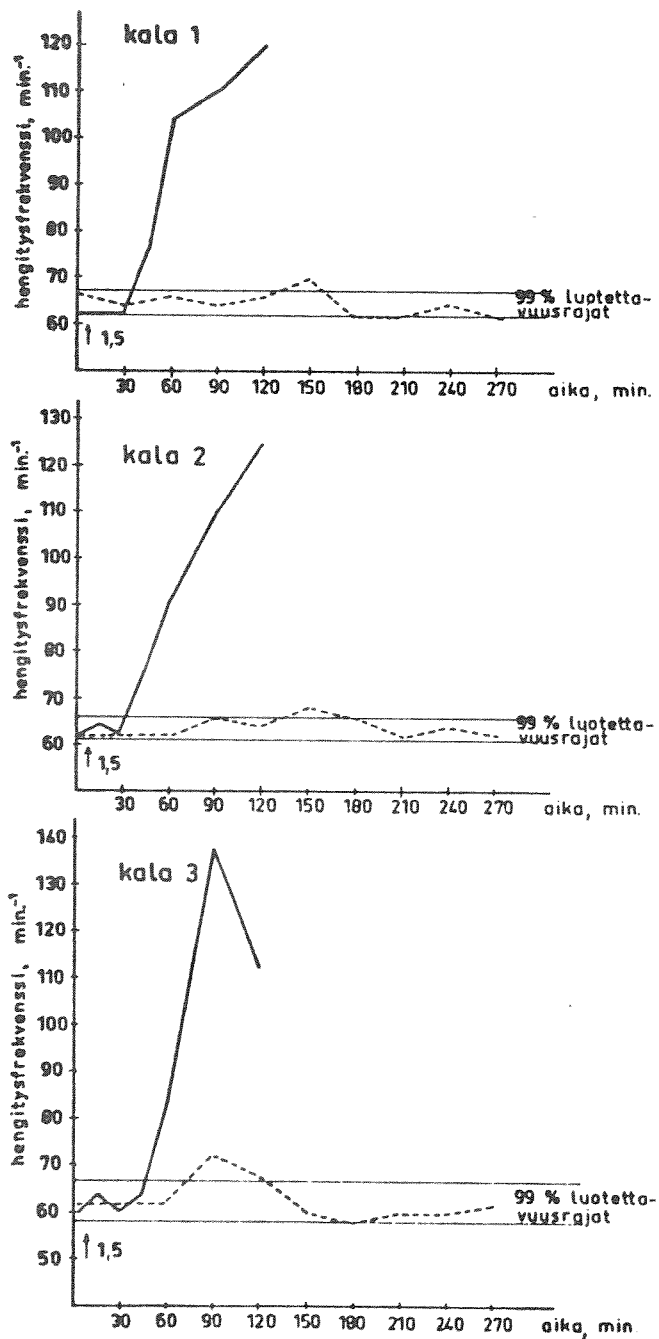
Hengitysfrekvenssit kasvoivat vähitellen ja olivat suurimmillaan kokeen lopussa (kuva 21).

Kokeessa 13 kalat altistettiin pitoisuudelle $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ kahden tunnin ajan, minkä jälkeen kuparipitoisuus kaksinkertaistettiin. Tulokset ovat liitteessä 19.

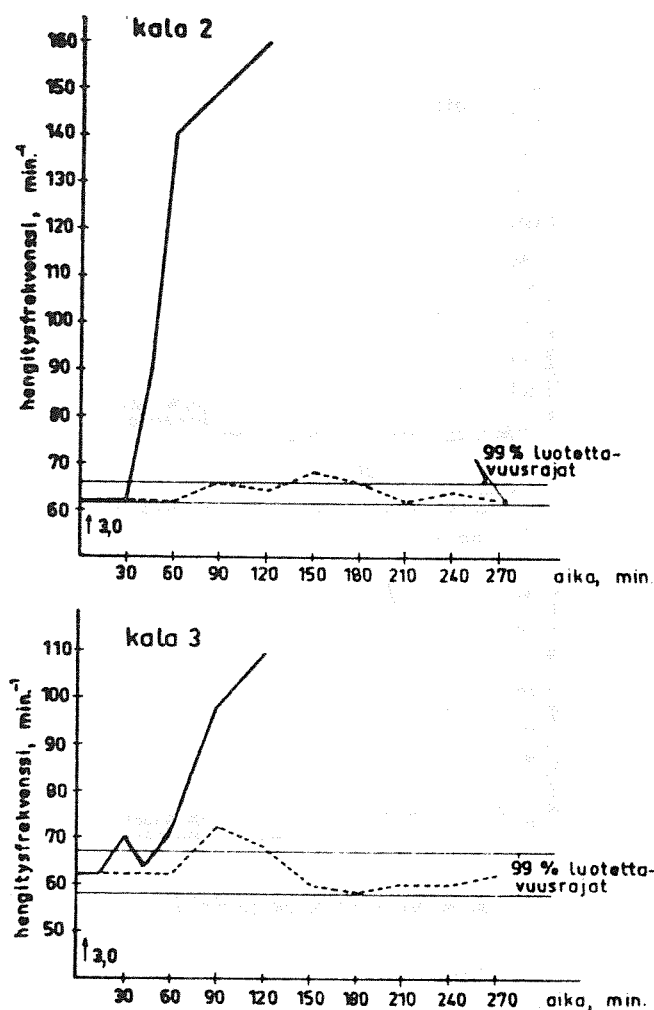
Koeveden lämpötila oli $17,9^{\circ}\text{C}$ ja pH ensimmäisen kuparilisäyksen jälkeen 7,9.

Kaloissa oli havaittavissa levottomuutta noin 15 minuutin kuluttua kokeen aloittamisesta ja ajoittain myöhemmin kokeen aikana. Kuparipitoisuuden kaksinkertaistaminen ei aiheuttanut levottomuutta.

Yksi kaloista kuoli kokeen jälkeen ja ajautui taka-anturin luokse.



Kuva 20. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 11 aikana. $\uparrow = \text{Cu}^{2+}$ -pitoisuuden suurentaminen.



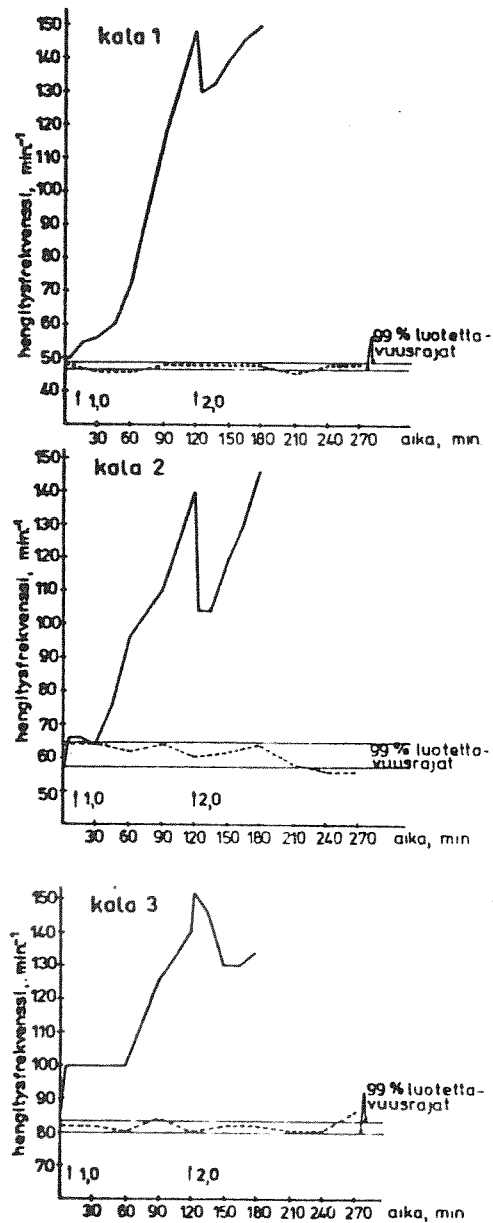
Kuva 21. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 12 aikana. ↑ = Cu²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Kalojen hengitys kiihtyi vähitellen kokeen aikana. Kuparipitoisuuden kaksinkertaistaminen suurensi vain yhden kalan hengitysfrekvenssiä (kuva 22).

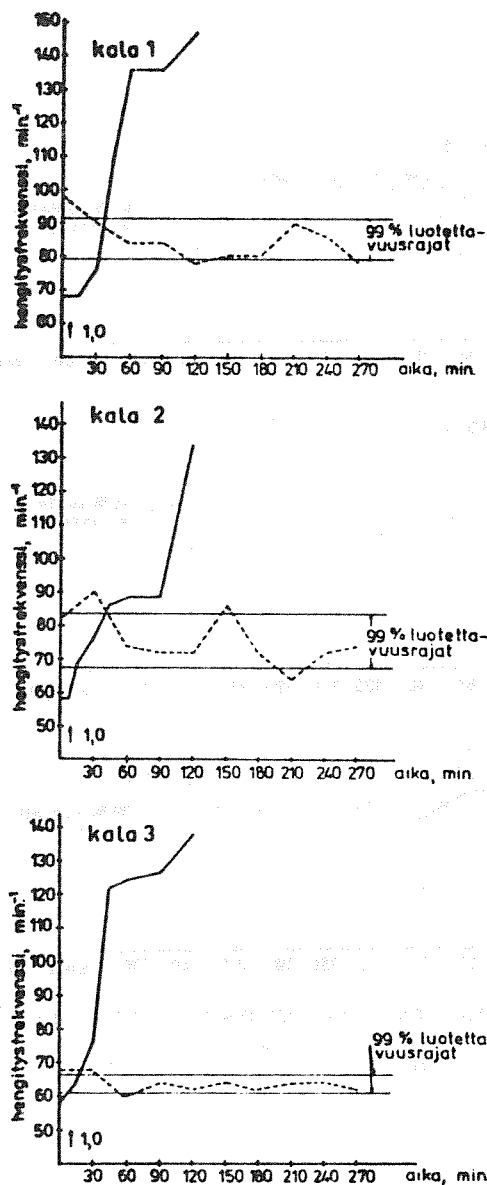
Koe 14 oli kokeen 13 toistokoe: kalat altistettiin pitoisuudelle 1,0 mg l⁻¹ Cu²⁺. Kokeella haluttiin varmistaa, reagoivatko kalat pulssimäärien perusteella pitoisuuteen 1,0 mg l⁻¹ Cu²⁺. Tulokset ovat liitteessä 20.

Kalat tulivat silmin nähden levottomiksi heti kokeen alettua. Levottomuutta jatkui jaksottaisesti noin tunnin ajan.

Kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat vähitellen ja olivat suurimmillaan kokeen lopussa. Yksi kala reagoi muita hitaammin (kuva 23).



Kuva 22. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 13 aikana. ↑ = Cu²⁺-pitoisuuden suurentaminen.



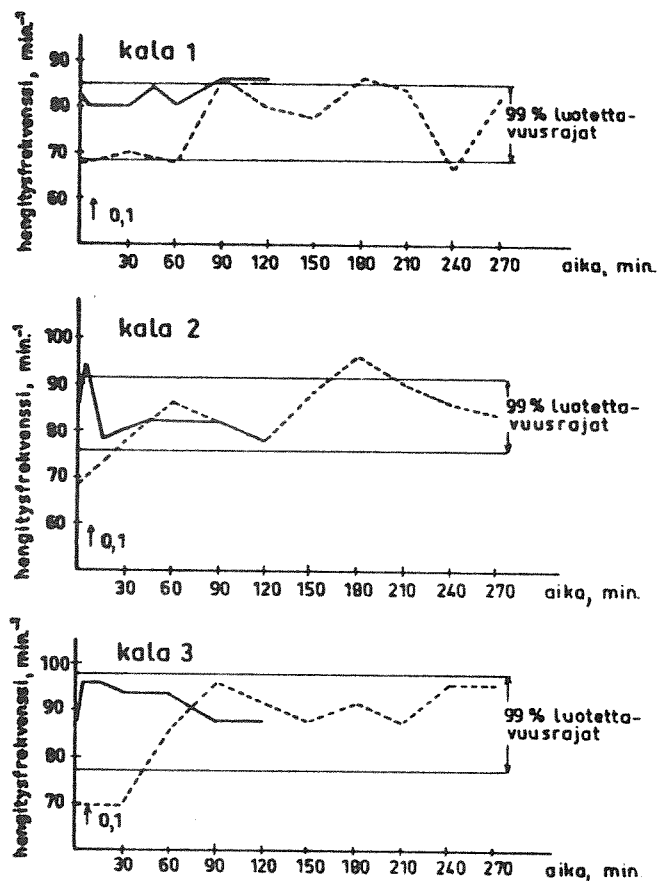
Kuva 23. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 14 aikana. ↑ = Cu²⁺-pitoisuuden suurentaminen.

Kokeessa 19 kalat altistettiin pitoisuudelle 0,1 mg l⁻¹ Cu²⁺, koska haluttiin etsiä pienin kuparipitoisuus, joka suurentaa kalojen hengitysfrekvenssejä kaksi tuntia kestävä kokeen aikana. Tulokset ovat liitteessä 21.

Koeveden lämpötila oli 19,5 °C ja pH 8,0.

Kalat havaitsivat kuparin läsnäolon heti ja tulivat hieman levottomiksi. Koekalat olivat hyvin levottomia myös normaalioloissa.

Hengitysfrekvenssit eivät suurentuneet merkittävästi kokeen aikana (kuva 24).



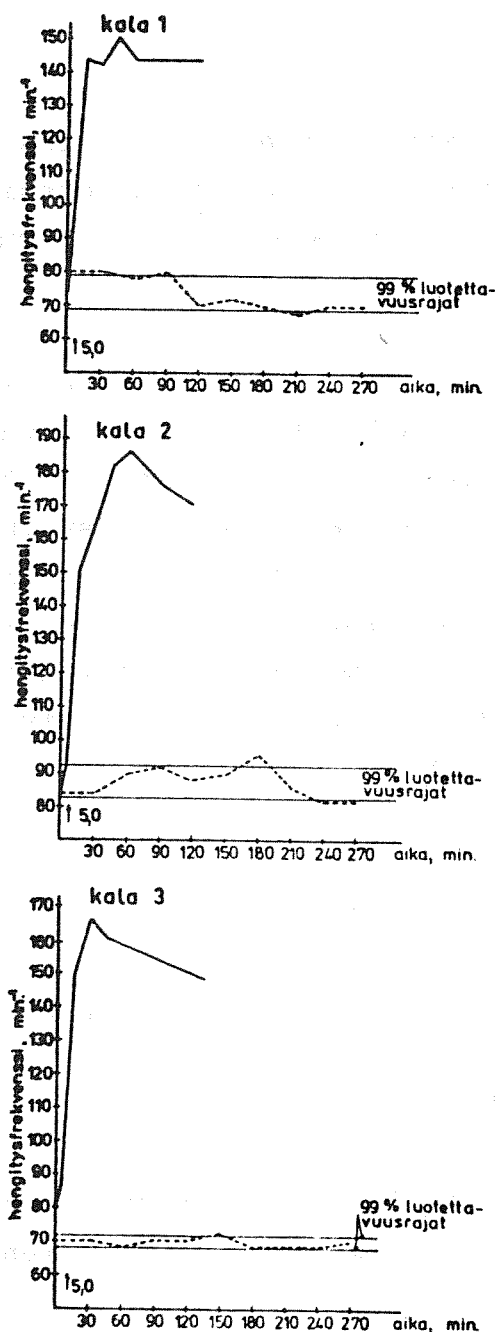
Kuva 24. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen 19 aikana. ↑ = Cu^{2+} -pitoisuuden suurentaminen.

Kokeessa 20 kalat altistettiin pitoisuudelle $5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, jotta voitaisiin vertailla eri kuparipitoisuuksien aiheuttamien reaktioiden voimakkuuksia. Tulokset ovat liitteessä 22.

Koeveden lämpötila oli $19,8^{\circ}\text{C}$ ja pH 7,3.

Kalat tulivat hieman leovottomiksi, mutta eivät käyneet altaan takaosassa normaalia useammin - poikkeuksena oli kala 2, joka kuolinkamppailussa uiskenteli antureiden välissä. Kala 2 kuoli heti kokeen loputtua, kalat 1 ja 3 noin tunnin kuluttua kokeen päättymisestä. Kuolleet kalat ajautuivat taka-anturin luokse.

Kalojen hengitys alkoi kiihtyä jo 15 minuutin kuluttua kokeen alkamisesta (kuva 25).



Kuva 25. Kalojen hengitysfrekvenssit normaalioloissa (katkoviiva) ja kokeen aikana. ↑ Cu²⁺ -pitoisuuden suurentaminen.

5.23 Kalojen yksilöllisyys ja raskasmetallipitoisuuden vaikutus kalojen reagoimisvoimakkuuteen

Kaloja visuaalisesti tarkkailtaessa havaittiin kalojen käyttäytyvän usein hyvinkin paljon toisistaan poikkeavasti. Käyttäytymiserot näyttivät olevan normaalioloissa suurempia kuin kokeiden aikana.

Kukin kala oli yksilöllinen: yksi kaloista saattoi olla paikallaan altaan puolivälissä, toinen altaan etuosassa ja kolmas uiskennella levottomasti edestakaisin.

Koska pulssimääräaineisto ei soveltunut tilastolliseen käsittelyyn, korrelaatioanalyysi tehtiin hengitysfrekvenssiaineistolla. Kalojen hengitysfrekvenssien väliset korrelaatiot normaalioloissa ja kokeiden aikana ovat liitteessä 23.

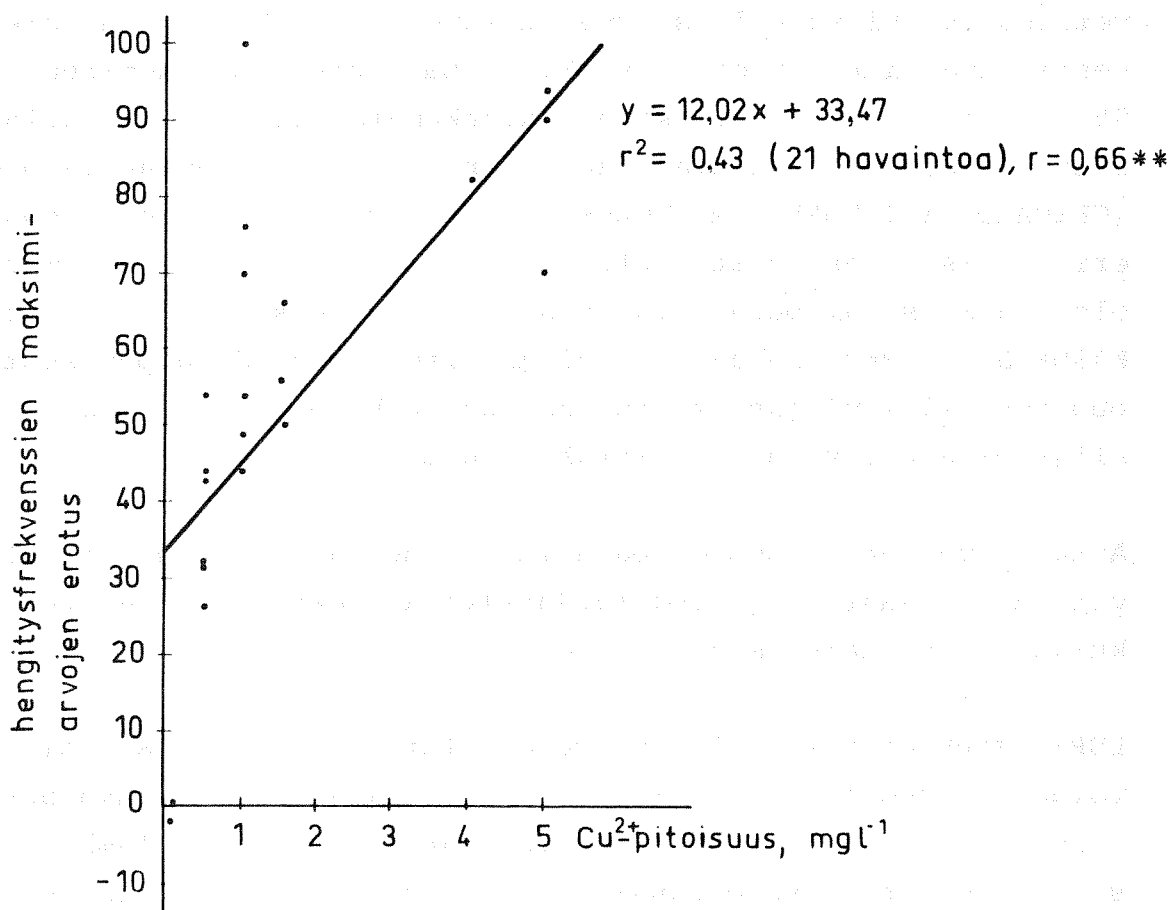
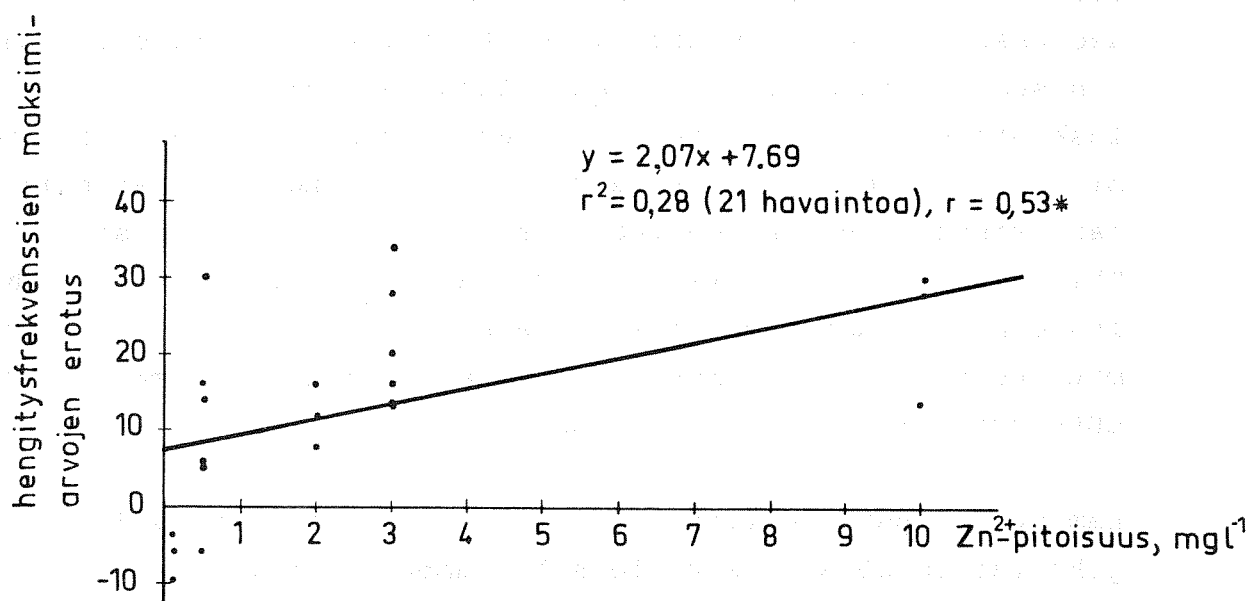
Eri raskasmetallipitoisuudet aiheuttivat kaloissa voimakkuudeltaan erilaisia reaktioita. Kun kalan aiheuttamasta maksimipulssimäärästä kokeen aikana vähennetään normaalioloissa saatu maksimipulssimäärä, saadaan erotus, joka kuvaa kalan reagoimisvoimakkuutta. Pulssimäärien erotuksen suuruus ei kuitenkaan ollut verrannollinen raskasmetallipitoisuuteen, vaan vaihteli satunnaisesti. Vastaava hengitysfrekvenssien erotus näytti paremmin kuvaavan reaktion voimakkuutta, joten regressioanalyysissä käytettiin hengitysfrekvenssiaineistoa. Tulokset ovat kuvassa 26.

6. T U L O S T E N T A R K A S T E L U A

6.1 LAITTEISTON TOIMIVUUS

Laitteiston toimintahäiriöistä suurin osa johtui antureiden toiminnan keskeytymisestä tai ylimääräisten pulssien syntymisestä.

Antureiden toiminnan keskeytyminen johtui ilmeisesti lamppujen valovoimakkuuden muuttumisesta tai transistorien epästabiiliudesta. Kytkennän alkupäässä olevat transistorit parantavat laitteiston herkkyyttä, mutta ovat lämpötilaherkkiä: kun transistorin lämpötila muuttuu, muuttuu se vastusarvo, joka LDR-vastuksessa tarvitaan pulssin aikaansaamiseksi. Laskentakeskus on suljettu metallikoteloon, jossa komponentit kuumenevat pitkäaikaisessa käytössä, jolloin em. syystä pulssien laskenta keskeytyy. Tehokas tuuletus alentaisi lämpötilaa ja vähentäisi toimintahäiriöitä. Laitteistossa olevat säätövastukset



Kuva 26. Raskasmetallipitoisuuden vaikutus kalojen reagoimis-
voimakkuuteen.

ovat karkeasäätöisiä. Säätovastusten muuttaminen tarkkuusvastuksiksi mahdollistaisi vastusten tarkemman säätämisen.

Ylimääräiset pulssit syntyivät laskijakortin toimintapisteen asetuksen virheellisyydestä. Muita syitä ylimääräisiin pulsseihin saattoivat olla verkkojännitteen vaihtelut sekä antureista laskentakeskukseen johtavat pitkät ja suojaamattomat johtimet: pitkiin johtimiin muista sähkölaitteista indusoituvat häiriöjännitteet voivat aiheuttaa pulsseja, joihin laitteisto reagoi. Tämä voitaisiin korjata vaihtamalla johdot suojaetuiksi. Myös lyhyemmät johdot saattaisivat vähentää häiriöitä - LDR-vastusten muutokset voitaisiin muuttaa pulsseiksi mahdollisimman lähellä LDR-vastuksia eli jo antureissa.

Lamppujen lyhyt ja vaihtelevan pituinen kesto aika voi johtua joko vaihtelevasta jännitteestä, lamppujen valmistusvaiheesta tulleista eroista tai lämpötilan kasvamisesta. Lamput rasittuvat lämpötilan noususta - lamput sijaitsevat puukehikoihin kaitvetuissa pienissä koloissa ja kuumenevat käytön aikana melkoisesti ilman huonon kierron vuoksi. Lamppujen kuumeneminen yli 95 °C:een aiheuttaa paitsi hehkulankamateriaalin myös lasin höyrystymistä, mikä lyhentää lamppujen ikää ja heikentää valotehoa (CHICAGO MINIATURE LAMP WORKS 1975). Eri antureiden lamppujen eri pituiset kestoajat johtuivat paitsi erilaisista palamisoloista myös lamppuihin tulevasta eri suuruisesta jännitteestä. KASURISEN (1969) mukaan 5 % ylijännite lyhentää lampun kestoajan puoleen, 10 % ylijännite neljäsosaan alkuperäisestä kestoajasta. Alijännite puolestaan pidentää lamppujen palamisaikaa.

Anturin muiden lamppujen palaminen yhden anturin lampun vaihdon yhteydessä saattoi johtua tärähtelystä, joka voi aiheuttaa hehkulangan ennenaikaisen katkeamisen.

LDR-vastukset voitaisiin korvata valotransistoreilla, jolloin voidaan paremmin eliminoida lampun palamisen aiheuttama anturin toiminnan keskeytyminen. Jokainen anturissa oleva lamppu ja sen tuntoelin (= valotransistori) olisi itsenäinen yksikkö, jol-

lolin yhden lampun palaminen ei vielä keskeyttäisi anturin toimintaa.

Koelaitteiston hollantilaista alkuperäismallia on parannettu - mm. sähköiskujärjestelyjä on tehostettu ja antureiden rakennetta muutettu (KIWA 1977). Lopullista versiota on ryhdytty markkinoimaan Hollannissa. Laitteistoa on testattu laboratoriossa ja Reinjoella neljän vuoden ajan. Tutkijat ovat vakuuttuneita laitteiston käyttökelpoisuudesta, vaikka luonnonoloissa ei ole saatu yhtään hälytyshavaintoa.

6.2 KALOJEN REAGOIMINEN JA HÄLYTYSHAVAINNOT

6.21 Y l e i s t ä

Kalat kävivät normaalioloissa koealtaan takaosassa (= katkaisivat valonsäteen) huomattavasti useammin kuin POELSin (1975, 1977) ja SALMELAN (1978) tutkimuksissa havaittiin. Reinjoella kirjoloheet aiheuttivat vain 10 - 20 pulssia vuorokaudessa (POELS 1975). SALMELAN (1978) tutkimuksessa 20 - 25 cm:n pituiset kalat aiheuttivat Kymijoen vedessä 0 - 18 pulssia/15 min. Tässä työssä samankokoisten kalojen aiheuttamat pulssimäärät olivat aktiivihiilisuo-datetussa johtovedessä jopa useita kymmeniä/15 min.

Selitys pulssimäärien suuruuteen voisi olla sähköiskun laimeus: kalat eivät oppineet välttämään sähkökenttää. Toisaalta sähköiskujärjestelyt olivat samat ja koekalat samankokoisia kuin SALMELAN (1978) tutkimuksessa, ja veden sähkönjohtavuus oli lisäksi suurempi. VIBERTin (1967) mukaan sähköiskun vaikutus kaloihin riippuu mm. kalalajista, kalan koosta, yleiskunnosta ja fysiologisesta tilasta. Sairaات ja huonokuntoiset kalat reagoivat laimeasti. Kokeissa käytetyt kalat olivat silmämääräisesti ja kuntokertoimien perusteella hyväkuntoisia. Melko pitkä varastointiaika on kuitenkin saattanut heikentää kalojen yleiskuntaa, vaikkakin kalat söivät hyvin ja kasvoivat varastoinnin aikana.

Suuret normaalioloissa havaitut pulssimäärät voivat johtua myös siitä, että kalat eivät viihdy koealtaissa eivätkä aktiivihiihli-suodatetussa johtovedessä. Kaloilla on koealtaissa rajoitettu liikkumistila eikä mitään piiloutumismahdollisuutta. Veden korkea lämpötila ja vedessä mahdollisesti jäljellä oleva kloori saattoivat lisätä kalojen levottomuutta. Klooria ei tarkistusluonteisissa analyysissä löydetty, mutta BRUNGSin (1973) mukaan kloorin on todettu olevan kaloille myrkyllistä jopa analyysitarkkuutta pienempinä pitoisuuksina.

Myös veden pieni virtausnopeus voisi olla syynä pulssimäärien suuruuteen: kalojen ei tarvitse aktiivisesti uida vastavirtaan, joten ne saattavat uiskennella edestakaisin saadakseen liikuntaa. Veden virtausnopeus oli kuitenkin KIWAN (1977) esittämää minimivirtausnopeutta suurempi. SALMELAN (1978) tutkimuksessa veden virtausnopeus oli huomattavasti pienempi kuin tässä työssä käytetty nopeus.

Jos etuantureihin kytketty hälytysjärjestelmä olisi ollut toiminnassa ja hälytyshavainto olisi perustunut ennalta asetetun pulssimäärän (laitteistossa säädettävissä 1 - 15 pulssia/15 min) ylittymiseen, olisi hälytyshavaintoja syntynyt runsaasti myös normaalioloissa. Nämä ns. väärät hälytykset aiheuttaisivat käytännön valvontatilanteessa hankaluuksia.

Myös kalojen hengitysfrekvenssit olivat normaalioloissa ajoittain suuria. Kalojen hengitys kiihtyi levottomien käyttäytymisjaksojen aikana ja hidastui vähitellen kalojen rauhoittuessa. Aktiivihiihli-suodatetussa johtovedessä mahdollisesti jäljellä oleva kloori tai veden korkea lämpötila saattoivat olla syynä hengitysfrekvenssien ajoittain melko korkeaan normaalitasoon.

6.22 S i n k k i k o k e e t

6.221 Reagoiminen pulssimäärien perusteella

Visuaalisen tarkkailun mukaan kalat havaitsivat jo pitoisuuden $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ aiheuttaman äkillisen veden laadun muutoksen ja tu-

livat levottomiksi. Levottomuus ei kuitenkaan aiheuttanut kuin yhden kalan reagoimisen pulssimäärien perusteella (koe 3). Kokeissa käytettyjen suurempien sinkkipitoisuuksien aiheuttama kalojen levottomuus havaittiin myös suurentuneina pulssimäärinä: jokaisessa kokeessa koetta 7 lukuunottamatta joku kolmesta kalasta reagoi.

Sinkkipitoisuuden kaksin- tai kolminkertaistaminen kahden tai yhden tunnin koeajan jälkeen aiheutti yleensä kaloissa silmin havaittavaa lievää levottomuutta, mutta useimmiten kalat eivät reagoineet pulssimäärien perusteella (kokeet 1 - 4). Kalat eivät reagoineet myöskään sinkkipitoisuuden kymmenkertaistamiseen (koe 3).

Kun kalat reagoivat pulssimäärien perusteella, ne reagoivat yleensä 45 minuutin kuluessa kokeen aloittamisesta. Yleensä levottomuus oli suurinta ensimmäisen 15 minuutin aikana, jonka jälkeen kalat rauhoittuivat vähitellen. Joskus rauhoittuminen oli täydellistä: kalat pysyivät paikoillaan kokeen loppuajan. Vastaavan ilmiön on havainnut BENGTSSON (1974), jonka sinkkikokeissa kokeen alussa ilmennyt hyperaktiivisuus muuttui kokeen edetessä hypoaktiivisuudeksi.

Kokeessa 7 kalat, joiden oli annettu toipua $1\frac{1}{2}$ vuorokautta puhtaassa vedessä kokeen 6 jälkeen, altistettiin alkuperäistä sinkkipitoisuutta hieman suuremmalle pitoisuudelle. Kaikki kalat tulivat hieman levottomiksi, mutta yksikään kaloista ei reagoinut. Ensimmäisessä kokeessa käytetty pitoisuus $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ oli ilmeisesti liian suuri ja toipumisaika ehkä liian lyhyt, jotta kalat olisivat pystyneet reagoimaan uudelleen. Esim. HÖGLUNDin (1978) mukaan sinkki tuhoaa kalojen hajuaistia, mikä selittäisi kokeen 7 tulokset: kalojen hajuaistin vaurioituminen esti sinkin havaitsemisen.

Kalojen altistaminen pitoisuudelle $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ noin kolmen viikon ajan näytti heikentävän kalojen sinkkinaistimis- ja siten reagoimiskykyä. Myös kalojen ruokahalun heikkeneminen sinkkialtistuksen aikana saattoi johtua hajuaistin vahingoittumisesta. Vain yksi kaloista reagoi pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja vasta tunnin kuluttua kokeen alkamisesta (koe 17), vaikka ilman etukäteisaltistusta tehdyissä kokeissa kaikki kalat reagoivat vastaavaan pitoisuuteen vä-

littömästi (kokeet 1 ja 15). Kaksi kaloista reagoi etukäteisaltistuksen jälkeen pitoisuuteen $10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, yksi kaloista ei aiheuttanut kokeen aikana yhtään pulssia (koe 18). Kalojen reagoimiskyvyn huononemiseen voi olla syynä pitkäaikaisaltistuksen aikana kaloissa puhjennut Flexibacter columnaris -bakteerin aiheuttama infektio. Sinkkialtistus ilmeisesti heikensi kalojen vastustuskykyä, sillä varastointialtaan kalat pysyivät terveinä.

6.222 Reagoiminen hengitysfrekvenssien perusteella

Pitoisuus $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ei aiheuttanut normaalioloissa mitattujen hengitysfrekvenssien maksimiarvon ylittymiseen perustuvaa kalojen reagoimista (koe 3). Pitoisuudessa $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja sitä suuremmissa pitoisuuksissa kaikkien kalojen hengitysfrekvenssit olivat yleensä kokeen jossakin vaiheessa normaalia suurempia.

Sinkkipitoisuuden moninkertaistamisen aiheuttama kalojen reagoiminen oli satunnaista. Pitoisuuden suureneminen vähitellen aiheutti huomattavasti lievemmän reaktion kuin pitoisuuden yht'äkkäinen suureneminen - vertaa kokeet 3 ja 15.

Joissakin kokeissa kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat välittömästi sinkkilisäyksen jälkeen, toisissa (kokeet 6, 7, 15 - 18) vasta vähitellen kokeen edetessä. Heti sinkkilisäyksen jälkeen suurentunut hengitysfrekvenssi lienee seurausta veden laadun äkillisen muutoksen aiheuttamasta säikähdyksestä; hengitysfrekvenssi aleni normaalitasolle vajaassa tunnissa, usein jo puolen tunnin kuluessa. Hengitysfrekvenssin suureneminen vähitellen johtuu ilmeisesti sinkin kidusepiteeliä tuhoavasta ja limanmuodostusta lisäävästä vaikutuksesta. Vaurioiden suuruus lienee lyhyissä kokeissa verrannollinen koeaikaan.

Puolen vuorokauden toipumisaika puhtaassa vedessä ei palauttanut kalojen reagoimiskykyä: kokeessa 4 pitoisuuteen $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ reagoineet kalat eivät reagoineet seuraavana päivänä saman suuruiseen sinkkipitoisuuteen. Reagoimiskyky ei ollut palautunut myöskään $1\frac{1}{2}$ vuorokauden toipumisajan jälkeen (kokeet 6 ja 7).

Kahden viikon altistus pitoisuudelle $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ heikensi kalojen reagoimiskykyä, sillä vain yksi kaloista reagoi altistuksen jälkeiseen pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (koe 17), vaikka ilman etukäteisaltistusta tehdyissä kokeissa 1 ja 15 kaikki kalat reagoivat vastaavaan pitoisuuteen. Sen sijaan kaikki kalat reagoivat pitoisuuteen $10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ myös pitkäaikaisaltistuksen jälkeen (koe 18).

Yhden kalan hengitysfrekvenssi ylitti normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille lasketun 99 % luotettavuusrajan jo pitoisuudessa $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (koe 3). Pitoisuudessa $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja sitä suuremmissa pitoisuuksissa kaikkien kalojen hengitysfrekvenssit ylittivät luotettavuusrajan ainakin väliaikaisesti.

Yksi kaloista reagoi toistuvasti pitoisuuteen $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ oltuaan puhtaassa vedessä 1/2 vuorokautta (koe 5); luotettavuusrajan ylitys oli kuitenkin väliaikaista kestäen vain 15 minuuttia. Myös kokeessa 7 kaksi kalaa näytti toipuneen aikaisemmasta altistuksesta pitoisuudelle $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja reagoi väliaikaisesti pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, molemmat vain yhdellä mittauskerralla.

Kaksi kaloista reagoi pitkäaikaisaltistuksen jälkeen pitoisuuteen $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, mutta hitaasti, vasta aivan kokeen lopussa (koe 17). Pitkäaikaisaltistus ei heikentänyt reagoimiskykyä pitoisuuteen $10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (koe 18).

Siten 99 % luotettavuusrajan ylittyminen ilmentää jonkin verran herkemmin hengitysfrekvenssien kasvua kuin normaalioloissa mitattujen hengitysfrekvenssien maksimiaron ylittyminen. Kalan reagoiminen havaitaan hieman aikaisemmin - useimmiten edellisellä 15 minuutin mittausjaksolla - ja ilmeisesti myös pienempiin pitoisuuksiin.

6.223 Hälytyshavainnot

Pulssimäärien suurenemiseen perustuvan hälytyshavainnon aiheuttanut alhaisin sinkkipitoisuus oli $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (kokeet 1 ja 15). Hälytyshavainto saatiin välittömästi sinkkilisäyksen jälkeen ensim-

mäisellä ja joskus myös toisella mittausjaksolla. Kokeissa 15 ja 18 saatiin lisäksi uusi hälytys 75 ja 120 minuutin kuluttua kokeen alkamisesta. Pitkäaikaisaltistuksessa olleet kalat eivät hälyttäneet pitoisuutta $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (koe 17) eivätkä myöskään sinkki-altistuksen jälkeen puhtaassa vedessä olleet kalat (koe 7).

Hengitysfrekvenssien kasvun perusteella saatiin hälytys jo pitoisuudessa $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (kokeet 2 ja 4). Hälytyshavainto syntyi välittömästi sinkkilisäyksen jälkeen tai myöhemmin kokeen edetessä.

Joskus hälytys saatiin useissa perättäisissä mittauksissa kokeen loppuun asti. 99 % luotettavuusrajan ylityksen perusteella hälytyshavainto syntyi myös pitkäaikaisaltistuksen jälkeisessä altistuksessa pitoisuudelle $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ (koe 17), tosin vasta aivan kokeen lopussa.

Eri sinkkipitoisuuksien aiheuttamien hälytyshavaintojen syntymiseen kulunut aika selviää taulukosta 3.

Taulukko 3. Sinkkikokeissa eri menetelmillä saadut hälytyshavainnot.

| Kokeen n:o | Sinkkipi- toisuus ($\text{mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$) | Hälytyshavainnon syntymiseen kuluva aika (min.) | | |
|---------------|--|---|--|--|
| | | maksimipulssi- määrän ylitys | hengitysfrekvenssien maksimiaron ylitys | hengitysfrekvenssien 99 % luotettavuusra- jan ylitys |
| 1 | 3,0 | 15 - 30 | 5 - 30 | 5 - 30, 60 - 120 |
| 2 | 0,5 | - | 5 - 15, 45 | 5 - 60 |
| 3 | 0,1 | - | - | - |
| 4 | 0,5 | - | 5 | 5 - 30 |
| 5 | 0,5 x | - | - | - |
| 6 | 2,0 | - | 120 | 120 |
| 7 | 3,0 x | - | - | - |
| 15 | 3,0 | 15, 75 | 45 - 120 | 45 - 120 |
| 16 | 10,0 | 15 - 30 | 45 - 120 | 30 - 120 |
| 17 | 3,0 a | - | - | 120 |
| 18 | 10,0 a | 15, 120 | 30 - 120 | 30 - 120 |

x = kalat altistettu edellisessä kokeessa, olleet välillä puhtaassa vedessä $1/2 - 1\frac{1}{2}$ vuorokautta

a = kalat altistettu pitoisuudelle $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 18-20 vuorokauden ajan

Koska laitteistossa on 15 minuutin pituinen pulssien mittausjakso, maksimipulssimäärien ylittymiseen perustuva hälytys voitiin saada aikaisintaan 15 minuutin kuluttua kokeen alkamisesta, vaikka pulsseja olisi syntynyt riittävästi jo esim. 5 minuutissa. Hengitysfrekvenssit mitattiin ensimmäisen kerran jo 5 minuutin kuluttua myrkyn lisäämisestä, joten hälytys voitiin saada aikaisemmin. Maksimipulssimäärän ylittymiseen perustuva hälytyshavainto syntyi joskus ennen hengitysfrekvenssien suurenemiseen perustuvaa hälytyshavaintoa.

Hengitysfrekvenssien suurenemisen perusteella saatiin hälytyshavainto usealla perättäisellä mittausjaksolla, kun taas maksimipulssimäärän ylittymisen perusteella vain kahdella mittausjaksolla.

Normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille laskettujen 99 % luotettavuusrajojen ylärajan ylitys ilmensi herkimmin veden laadun muutoksia: hälytys saatiin joko samanaikaisesti tai ennen kuin normaalioloissa havaittu suurin hengitysfrekvenssi ylittyi, ja hälytys kesti jonkin verran kauemmin. Menetelmillä saatujen tulosten erot ovat kuitenkin pieniä ja luotettavuusrajamenetelmällä saatu lisäinformaatio on vähäistä analyysin suurempaan työmäärään suhteutettuna. Toisaalta väärrien hälytysten syntymisen vaara on suurin herkintä menetelmää käytettäessä.

Vaikka taka-antureihin kytketty hälytysjärjestelmä olisi ollut toiminnassa, ei olisi saatu hälytystä, sillä kalat eivät missään kokeessa viipyneet 5 minuuttia taka-antureista tulevien valonsäteiden edessä.

6.224 Vertailua muihin tutkimustuloksiin

Kirjoloheille kuolettavat sinkkipitoisuudet vaihtelevat veden laadun ja altistusajan mukaan. Esimerkiksi BALL (1967) on saanut LC50-arvoksi 5 vuorokautta kestäneissä kokeissa $4,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ja BROWN ja DALTON (1970) 2 vuorokauden kokeissa $4,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. LIEBMANNIN (1960) mukaan $25 - 50 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ aiheuttaa kirjolohien kuoleman kahdessa tunnissa. Tässä työssä tehdyissä kokeissa kalat

hälyttivät siten letaaleja pitoisuuksia pienempien sinkkipitoisuuksien läsnäolon.

Sinkin subletaaleja vaikutuksia on tutkittu paljon. Tutkimustulosten vertailu on kuitenkin vaikeaa, sillä paitsi koeorganismit myös koejärjestelyt vaihtelevat. WALLERin ja CAIRNSin (1972) kokeissa $2,94 - 3,64 \text{ mgl}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ oli pienin pitoisuus, joka suurensi koekalojen aktiivisuutta, mikä on samaa suuruusluokkaa kuin tässä työssä saadut tulokset. SPARKS ym. (1972) havaitsivat koekalojen hengitysfrekvenssien suurenevan pitoisuudessa $2,55 \text{ mgl}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Pienempien pitoisuuksien vaikutuksia ei kokeissa tutkittu. Kokeet kestivät useamman vuorokauden ja pitoisuus nousi kokeiden aikana vähitellen. Koeorganismina oli Lepomis macrochirus.

CAIRNS ym. (1973) eivät havainneet 37 viikon altistuksen LC50-arvon sadasosalle vaikuttaneen pitoisuuden $3,0 \text{ mgl}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ havaitsemiseen. Tässä työssä jo 2 viikon altistus pitoisuudelle $0,3 \text{ mgl}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ heikensi havaitsemiskykyä. Ilmeisesti pitkäaikaisaltistuksessa käytetyn pitoisuuden suuruus on ratkaiseva havaitsemiskyvyn säilymisen kannalta.

6.23 K u p a r i k o k e e t

6.231 Reagoiminen pulssimäärien perusteella

Kalat havaitsivat silmin nähden jo $0,1 \text{ mgl}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, mutta yksikään kala ei reagoinut pulssimäärien perusteella (koe 19). Tosin kalojen aiheuttamat pulssimäärät olivat normaalioloissakin ajoittain hyvin suuria, mikä saattoi johtua koeveden korkeasta lämpötilasta. Yksi kaloista reagoi laimeasti toistokokeessa pitoisuuteen $0,5 \text{ mgl}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (koe 9). $1,0 \text{ mgl}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ja sitä suuremmat pitoisuudet aiheuttivat yhden tai useamman kalan reagoimisen. Kokeessa, jossa käytettiin suurinta kuparipitoisuutta $5,0 \text{ mgl}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (koe 20), ainoastaan yksi kaloista reagoi aivan kokeen lopussa, vaikka kalat tulivat silmin nähden levottomiksi kokeen alussa. Odottamattomaan koetulokseen voisi olla syynä veden korkea lämpötila, tai suuren kuparipitoisuuden aiheuttama "shokki" - kalat lamaantuivat.

Kokeessa 8 kalat eivät reagoineet kuparipitoisuuden kaksinkertaistamiseen, mutta kaikki reagoivat, kun pitoisuus kymmenkertaistettiin.

Kun kalat reagoivat, ne reagoivat yleensä 45 minuutin kuluessa kokeen alkamisesta. Yleensä kalat reagoivat useamman kerran kokeen aikana, kokeessa 11 yksi kaloista reagoi jokaisella mittausjaksolla.

Kokeissa 10 ja 12 kalat altistettiin 1/2 - 1 1/2 vuorokauden toipumisajan jälkeen uudelleen kuparille. Kokeessa 10 kaksi kalaa reagoi alkuperäiseen pitoisuuteen nähden kolminkertaiseen pitoisuuteen. Kokeessa 12 kalat eivät reagoineet kaksinkertaiseen pitoisuuteen. Syynä tulosten erilaisuuteen voi olla sattuma, erisuuruiset pitoisuudet tai eripituiset toipumisajat. Kalojen hajuaisti oli saattanut huonontua kokeessa 11 käytetyn pitoisuuden $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ vaikutuksesta - esim. HARA ym. (1976) havaitsivat kuparin vahingoittavan kalojen hajuaistia.

6.232 Reagoiminen hengitysfrekvenssien perusteella

Pitoisuus $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ja sitä suuremmat pitoisuudet aiheuttivat yhden tai useamman kalan reagoimisen normaalioloissa mitattujen hengitysfrekvenssien maksimiarvon ylittymisen perusteella.

Kuparipitoisuuden kaksinkertaistaminen kahden tunnin koeajan jälkeen aiheutti kaikkien kalojen reagoimisen (kokeet 8, 13 ja 20). Hengitysfrekvenssit suurenivat vielä, kun pitoisuus kymmenkertaistettiin (koe 8).

Hengitysfrekvenssit suurenivat kokeen aikana vähitellen ja olivat yleensä suurimmillaan kokeen lopussa. Hengitysfrekvenssin suureneminen vähitellen ilmentää altistusajan funktiona pahenevia kiusvaurioita.

Kalat reagoivat hengitysfrekvenssien suurenemisen perusteella myös kokeissa 10 ja 12: aikaisempi kuparialtistus ei ollut heikentänyt

reagointikykyä tai kalat olivat toipuneet puhtaassa vedessä.

Kaksi kaloista reagoi normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille laskettujen 99 % luotettavuusrajojen ylärajan ylittymisen perusteella pitoisuuteen $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ - toinen heti kokeen alussa, toinen vasta $1\frac{1}{2}$ tunnin kuluttua (koe 19). Reagoiminen oli hyvin laimeaa. Kaikissa muissa kokeissa kaikkien kalojen hengitysfrekvenssit ylittivät normaalioloissa mitatuille hengitysfrekvensseille lasketun 99 % luotettavuusrajan. Raja ylittyi joko heti myrkkylisäyksen jälkeen (esim. koe 13) tai noin 45 - 60 minuutin kuluttua (esim. koe 11). Hengitysfrekvenssit pysyivät 99 % luotettavuusrajan yläpuolella aina kokeen loppuun saakka.

Hengitysfrekvenssin suureneminen havaittiin 99 % luotettavuusrajan ylittymisen perusteella samanaikaisesti tai jonkin verran aikaisemmin kuin normaalioloissa mitatun suurimman hengitysfrekvenssin ylittymisen perusteella. Ero oli kuitenkin melko pieni. Ilmeisesti luotettavuusraja ylittyy myös pienempien pitoisuuksien vaikutuksesta kuin suurin hengitysfrekvenssi - tässä yksi kaloista reagoi pitoisuuteen $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 99 % luotettavuusrajan, muttei suurimman hengitysfrekvenssin ylittymisen perusteella.

6.233 Hälytyshavainnot

Pulssimäärien suurenemisen perusteella kalat tuottivat hälytyshavainnon $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ -pitoisuudessa 45 minuutin kuluttua kokeen alkamisesta (koe 13 ja 14). Kalat eivät enää kyenneet hälyttämään pitoisuutta $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (koe 12) vaikka ne saivat toipua puhtaassa vedessä hälytettyään ensin $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ edellisessä kokeessa. Kokeessa 20 kalat eivät hälyttäneet pitoisuutta $5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, vaikka kuolivat kokeen päätyttyä. Ilmeisesti suuri kuparipitoisuus aiheutti kalojen lamaantumisen, sillä kalat pysyttelivät miltei päikoillaan alkulevottomuuden jälkeen.

Hengitysfrekvenssien suurenemisen perusteella kalat hälyttivät jo $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ja ensimmäiset hälytykset saatiin hengitysfrekvens-

sien suurimman arvon ylityksen perusteella 45 ja 60, 99 % luotettavuusrajan ylityksen perusteella 5 ja 45 minuutin kuluttua (kokeet 8 ja 9). Ensimmäisen hälytyksen jälkeen saatiin hälytys jokaisella mittausjaksolla kokeen loppumiseen asti.

Eri kuparipitoisuuksien aiheuttamien hälytyshavaintojen syntymiseen kulunut aika selviää taulukosta 4.

Taulukko 4. Kuparikokeissa eri menetelmillä saadut hälytyshavainnot.

| Kokeen n:o | kuparipitoisuus (mg l ⁻¹) | Hälytyshavainnon syntymiseen kuluva aika (min.) | | |
|------------|---------------------------------------|---|--|--|
| | | maksimipulssimäärän ylitys | hengitysfrekvenssien maksimiarvon ylitys | hengitysfrekvenssien 99 % luotettavuusrajan ylitys |
| 8 | 0,5 | - | 45 - 120 | 5 - 120 |
| 9 | 0,5 | - | 60 - 120 | 60 - 120 |
| 10 | 1,5 x | - | 60 - 120 | 60 - 120 |
| 11 | 1,5 | 30 - 60 | 45 - 120 | 45 - 120 |
| 12 | 3,0 x | - | 90 - 120 | 60 - 120 |
| 13 | 1,0 | 45 | 15 - 120 | 5 - 120 |
| 14 | 1,0 | 45 | 45 - 120 | 45 - 120 |
| 19 | 0,1 | - | - | - |
| 20 | 5,0 | - | 5 - 120 | 5 - 120 |

x = kalat altistettu edellisessä kokeessa, olleet välillä puhtaassa vedessä 1/2 - 1 1/2 vuorokautta

Hengitysfrekvenssien suurenemisen perusteella saatiin hälytyshavainto usealla perättäisellä mittauskerralla kokeen loppuun asti, kun taasaksimipulssimäärän ylittymisen perusteella korkeintaan kahdesti kokeen aikana.

Kokeessa 11 saatiinaksimipulssimäärän ylittymisen perusteella hälytyshavainto hieman aikaisemmin kuin hengitysfrekvenssin ylittymisen perusteella.

Nopeimmin hälytyshavainto saatiin 99 % luotettavuusrajan ylitykseen perustuvalla menetelmällä, kolmessa kokeessa (kokeet 8, 12 ja 13) aikaisemmin kuin hengitysfrekvenssien maksimiarvon ylittymiseen perustuvalla menetelmällä.

Jos taka-antureihin kytketty hälytysjärjestelmä olisi ollut toiminnassa, olisi saatu hälytys kokeiden 8 ja 20 päätyttyä, jolloin kaikki kalat olivat kuoltuaan ajautuneet taka-anturin luokse.

6.234 Vertailua muihin tutkimustuloksiin

Kupari on kaloille myrkyllisempää kuin sinkki. BROWNin ym. (1970) kokeissa LC_{50}_{48h} oli kirjolohelle $0,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$.

C.L.M. Poelsin (kirjeell. tied. 20.3.1978) kokeissa kirjolohet hälyttivät $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ $2\frac{1}{2}$ tunnin kuluttua kokeen alkamisesta. $1,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ vastaa noin $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, joten kalat hälyttivät pienemmän pitoisuuden kuin tässä työssä tehdyissä kokeissa. Tosin kalojen reagoimista seurattiin tässä työssä vain kaksi tuntia - kalat olisivat kenties reagoineet pitemmän ajan kuluessa.

Kupari vahingoittaa kalojen kiduksia ja aiheuttaa siten hengitysfrekvenssien suurenemista. MORGANin ja KÜHNin (1974) kokeissa pitoisuudet 5,0, 1,0 ja $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ aiheuttivat koekalojen hengityksen kiihtymistä, pitoisuus $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ tosin vasta kahden vuorokauden altistusajan jälkeen. O'HARA (1971) ei havainnut pitoisuuden $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ lisäävän koekalojen hapenkulutusta. Molempien tutkijoiden käyttämät koejärjestelyt ja koeorganismit poikkesivat tässä työssä käytetyistä järjestelyistä, mutta kokeista voidaan kuitenkin havaita reagoimiskynnyksen olevan samaa suuruusluokkaa kuin tässä työssä saadut tulokset.

6.24 Sinkki- ja kuparikokeiden vertailua

Visuaalisesti havainnoiden näytti siltä, että kalat aistivat sinkin jonkin verran kuparia nopeammin. Hälytyshavaintoon kuluneen ajan perusteella kalat hälyttivät sinkin läsnäolon aikaisemmin kuin kuparin (taulukot 3 ja 4). Pulssimäärien perusteella kalat hälyttivät sinkin läsnäolon ensimmäisellä ja kuparin aikaisintaan toisella mittausjaksolla. Kupari aiheutti hälytyksen pienemmässä pitoisuudessa ($1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$) kuin sinkki ($3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$) - kupari onkin kaloille myrkyllisempää kuin sinkki.

Hengitysfrekvenssien perusteella kalat hälyttivät ensimmäisissä kokeissa sinkin läsnäolon välittömästi, mutta myöhemmin tehdyissä kokeissa hälytyksen syntymiseen kului aikaa likimain yhtä paljon kuin kuparikokeissa. Pienimmät hälytyksen aiheuttaneet Zn^{2+} - ja Cu^{2+} -pitoisuudet olivat $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (kokeet 2, 4, 8 ja 9).

Kalat toipuivat kuparikokeen jälkeen puhtaassa vedessä $1/2 - 1^{1/2}$ vuorokaudessa ja kykenivät hälyttämään hengitysfrekvenssien suurenemisen perusteella kolme ja kaksi kertaa alkuperäisen Cu^{2+} -pitoisuuden suuruisen pitoisuuden (kokeet 10 ja 12). Sinkkikokeen jälkeen toipumassa olleet kalat eivät kyenneet hälyttämään samansuuruista tai puolitoistakertaista sinkkipitoisuutta. Syynä tulosten erilaisuuteen saattoi olla alkuperäiseen pitoisuuteen nähden erisuuruiset pitoisuudet.

Hälytyshavainnon syntymiseen kulunut aika ei riippunut sinkki- tai kuparipitoisuuden suuruudesta.

Kalan reaktion voimakkuutta eri suuruisiin sinkki- ja kuparipitoisuuksiin kuvaa kokeen aikana ja normaalioloissa mitattujen suurimpien hengitysfrekvenssien erotus. Kuvasta 26 nähdään kuparin aiheuttaneen suuremman hengitysfrekvenssien kasvun kuin sinkki. Kuparikokeissa hengitysfrekvenssien maksimiarvojen erotus korreloi paremmin kuparipitoisuuden kanssa kuin sinkkikokeissa sinkkipitoisuuden kanssa: kuparikokeille laskettu korrelaatiokerroin ($r = 0,66$) erosi nollasta merkittävästi, sinkkikokeille laskettu korrelaatiokerroin

($r = 0,53$) erosi nollasta melkein merkittävästi.

Kalat olivat kuparikokeiden jälkeen huomattavasti huonokuntoisempia kuin sinkkikokeiden jälkeen. Kahdessa kuparikokeessa (kokeet 8 ja 20) kaikki kalat kuolivat.

Fysiologisilta vaikutuksiltaan samantyyppiset sinkki ja kupari aiheuttivat siten eriasteisia reaktioita. Kupari osoittautui myös näissä kokeissa sinkkiä voimakkaammaksi kalamyrkyksi, mutta vaikutti sinkkiä hitaammin. Jos kahden eri raskasmetallin aiheuttamat reaktiot poikkeavat toisistaan, on ilmeistä, että myös kokonaan erityyppisten aineiden ja jätevesien aiheuttamat reaktiot ovat erilaisia.

6.25 K a l o j e n v ä l i s e t y k s i l ö l l i s e t e r o t

Kalat käyttäytyivät yksilöllisesti sekä normaalioloissa että kokeiden aikana. Kokeiden aikana yksi kala kolmesta poikkesi usein käyttäytymiseltään selvästi muista. Yksilöllisyys oli havaittavissa sekä visuaalisesti että pulssimäärien ja hengitysfrekvenssien joskus hyvinkin erisuuruusina arvoina samalla mittausjaksolla. Etenkin pulssimäärissä oli kalojen välillä suuria eroja. Pulssimäärät kertovat kalan käymistiheyden altaan takaosassa, mihin vaikuttavat veden laadun muutosten ohella mm. kalan mielihalut.

Myös kalojen hengitysfrekvenssien välillä oli suuria eroja etenkin normaalioloissa. Esimerkiksi koetta 13 edeltävänä päivänä kolmosaltaan kalan hengitysfrekvenssi oli normaalioloissa melkein kaksinkertainen ykkösaltaan kalan hengitysfrekvenssiin verrattuna. Sen sijaan kokeiden aikana yleensä kaikkien kalojen hengitykset kiihtyivät.

Toiset kalat kestivät sinkkiä ja kuparia paremmin kuin toiset ja reagoivat hitaammin. Yksi kaloista kuoli kokeiden 11, 13 ja 16 jälkeen, mutta toiset kalat näyttivät olevan vielä hyväkuntoisia.

Kalojen erilaisuutta kuvaavat kalojen hengitysfrekvenssien väliset korrelaatiokertoimet ovat liitteessä 23. Korrelaatiokertoimet olivat selvästi suurempia kokeiden aikana kuin normaalioloissa: normaalioloissa kertoimet vaihtelivat 0,01 - 0,88, kokeiden aikana 0,12 - 0,98. Kalojen väliset yksilölliset erot olivat siten kokeiden aikana pienempiä kuin normaalioloissa - fysiologisen stressin alaisena kalat reagoivat vähemmän yksilöllisesti. Normaalioloissa kalojen hengitysfrekvenssit vaihtelivat melko satunnaisesti mm. uintiaktiivisuuden mukaan. Kokeissa kaikkien kalojen hengitysfrekvenssit suurenivat joko väliaikaisesti heti kokeen alettua tai raskasmetallien myrkyvaikutuksen edetessä.

Kalojen välisten yksilöllisten erojen vaikutusta automaattisessa biologisessa tarkkailussa syntyviin hälytyshvaintoihin voidaan vähentää käyttämällä veden laadun muuttumisen ilmentäjinä useampia kaloja ja asettamalla hälytyskriteeriksi useamman kalan samanaikainen reagoiminen. Hengitysfrekvenssien suureneminen näytti olevan vähemmän altis kalojen välisten yksilöllisten erojen aiheuttamalle vaihtelulle kuin kalojen aktiivisuuden ja levottomuuden suurentuminen.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

7.1 LAITTEISTON TOIMIVUUS JA KEHITTÄMISTARVE

Koelaitteisto toimi huonosti laboratorio-oloissa - toimintahäiriötä ilmeni noin joka toinen vuorokausi. Vaikka laitteistoa korjattiin ja uusittiin Kymijoella kokeilun jälkeen, siinä ilmeni laboratorioskokeiden aikana uusia vikoja ja heikkouksia. Näin ollen laitteistoa ei voi suositella maastokäyttöön ennen kuin sähkötekniset puutteet on korjattu ja toimintavarmuus on parantunut.

Laitteistoon olisi tehtävä seuraavia parannuksia:

- järjestettävä laskentakeskukseen tuuletus
- muutettava säätövastukset tarkkuusvastuksiksi
- suojattava ja lyhennettävä antureista laskentakeskukseen johtavat johtimet
- korvattava LDR-vastukset valotransistoreilla
- järjestettävä tuuletus antureiden lamppukoloihin
- tehostettava sähköiskujärjestelyjä
- kunnostettava hälytysjärjestelmät

Korjausten jälkeen laitteisto on testattava uudelleen laboratoriossa.

Kenttäoloissa koelaitteiston toimivuus (mm. lamppujen palaminen) ja kalojen kunto on tarkistettava päivittäin. Laitteistoon on kytkettävä luotettavasti toimiva piirturi.

7.2 KÄYTETTYJEN MENETELMIEN KÄYTTÖKELPOISUUS VEDEN LAADUN TARKKAILUUN

Koelaitteiston heikkoudet vaikeuttivat kalojen rheotaksisuuden määrittämistä, levottomuutta ja pakoreaktioita mittaavan menetelmän käyttökelpoisuuden arvioimista. Laitteistolla pystyttiin havaitsemaan veden laadun äkillisen, kaloille haitallisen muutoksen aiheuttama kalojen levottomuus ja pakoreaktio, jotka ilmenivät melko nopeasti veden laadun muutoksen jälkeen. Kalan kunnan heikkenemisestä johtuvaa rheotaksisuuden menetystä ei lyhytaikaisissa kokeissa havaittu. Rheotaksisuuden menetys onkin melko myöhäinen myrkytysoire ja saattaa siten olla liian hidas reaktio mitattavaksi veden laadun tarkkailussa. Luotettavien tulosten saamiseksi kaloja oli seurattava jatkuvasti myös visuaalisesti. Visuaalinen tarkkailu oli tarpeellista lähinnä kalojen pyrstöillä aiheuttamien pulslien havaitsemiseksi. Ns. pyrstöpulssien syntymistä voitaisiin vähentää tehostamalla sähköiskujärjestelyjä.

Sinkki- ja kuparikokeiden tulokset osoittavat, että kalojen hengitysfrekvenssien visuaalisella mittaamisella havaitaan pienempien me-

tallipitoisuuksien aiheuttama veden laadun äkillinen muuttuminen kuin rekisteröimällä kalojen levottomuutta ja pakoreaktioita koe-laitteistolla. Kalat tulivat tosin silmin nähden levottomiksi jo myös pienimmissä metallipitoisuuksissa, mutta laitteisto ei rekis-teröinyt tätä lievää levottomuutta. Levottomuus ja pakoreaktio olivat ohimeneviä ilmiöitä ja ilmenivät yleensä heti myrkkylisäyk-sen jälkeen. Hengitysfrekvenssit taas suurenivat vähitellen ja olivat normaalia suurempia useamman mittausjakson ajan. Levotto-muus ja pakoreaktio kuvasivat lähinnä kalojen säikähtämistä, kun taas hengitysfrekvenssien suureneminen aiheutui ilmeisesti sinkin ja kuparin myrkkyyvaikutuksesta. Hengitysfrekvenssien suureneminen saattaa siten olla luotettavampi myrkkyyvaikutuksen osoittaja kuin käyttäytymisen muuttuminen. Lisäksi kalat reagoivat veden laadun äkilliseen muutokseen yhtenäisemmin hengitysfrekvenssien kuin puls-simäärien suurenemisen perusteella. Veden laadun valvonnassa ka-lojen hengitysfrekvenssejä voidaan mitata sähköisesti kalan ruu-miin ulkopuolisilla elektrodeilla, mihin liittyy mm. mittaustek-nisiä hankaluuksia.

Koska kokeita tehtiin vain kahdella eri aineella, ei tuloksia pi-dä yleistää: myrkyllisten aineiden vaikutusmekanismit ja vaiku-tuskohteet ovat erilaisia. Kokeissa havaittiin, että kalojen reagoimisvoimakkuus fysiologisilta vaikutusmekanismeiltaan saman-kaltaisiin sinkkiin ja kupariin oli erilainen. Ilmeisesti reagoi-misvoimakkuus täysin erityyppisiin myrkkyyihin vaihtelee vielä enemmän. Kalat aistivat jotkut myrkyt, kuten kokeissa sinkin ja kuparin välittömästi. Toiset myrkyt taas voivat aiheuttaa kalan kuoleman tekemättä kalaa missään vaiheessa levottomaksi, jolloin laitteistolla ei havaittaisi äkillistä myrkkypäästöä ennen kalan kunnon huomattavaa heikkenemistä. Erilaiset myrkyt saattavat suu-rentaa tai pienentää hengitysfrekvenssejä tai vaikuttaa vain hen-gityksen syvyyteen. Jotkut myrkyt eivät vaikuta kalojen hengi-tykseen, jolloin hengitysaktiivisuuden mittaamisella ei havaittai-si myrkkypäästöä. Veden laadun automaattisen biologisen tarkkai-lun olisi perustuttava sen suureen mittaamiseen, johon tarkkailta-van veden kaloille haitalliset aineet vaikuttavat.

Kokeet osoittavat, että jatkuva altistus pienelle myrkkypitoisuudelle saattaa heikentää kalan reagoimiskykyä. Veden laadun tarkkailutilanteessa kalat saattavat joutua olemaan jatkuvasti alttiina jätevedelle tai sen laimennukselle. Tällöin kalat voivat tottua jäteveden sisältämiin myrkkyyhin tai myrkyt saattavat vahingoittaa esimerkiksi kalojen hajuaistia, jolloin kalat eivät ehkä enää pysty hälyttämään äkillistä myrkkypäästöä. Kokeissa kalat eivät aina kyenneet reagoimaan myöskään toistuviin, suuriin myrkkypitoisuuksiin, eikä $1/2 - 1\frac{1}{2}$ vuorokauden toipumisaika ollut riittävä reagoimiskyvyn palauttamiseksi. Käytännön valvontatilanteessa on siten tärkeää vaihtaa kalat paitsi myrkkypäästön jälkeen myös muulloin riittävän lyhyin väliajoin.

Koekalojen väliset, ajoittain suuret käyttäytymiserot heikentävät kalojen rheotaksisuuden menetyksen, levottomuuden ja pakoreaktioiden mittaamiseen perustuvan menetelmän käyttökelpoisuutta automaattiseen biologiseen veden laadun tarkkailuun. Jos laitteisto osoittautuu korjausten jälkeen moitteettomasti toimivaksi, on rakennettava rinnakkaislaitteisto menetelmän luotettavuuden parantamiseksi ennen laitteiston ottamista veden laadun valvontakäyttöön.

Koelaitteiston edelleen kehittelyn lisäksi olisi tutkittava muiden jo melko pitkälle kehitettyjen, esimerkiksi kalojen hengitys- ja yskimisfrekvenssien mittaamiseen perustuvien menetelmien soveltuvuutta automaattiseen biologiseen veden laadun tarkkailuun, sillä erilaiset jätevedet vaativat erilaisia menetelmiä. Kahden tai useamman suureen mittaaminen laajentaisi menetelmän sovellettavuus- aluetta, mutta monimutkaistaisi mittaus- ja tulostusjärjestelyjä. Jos halutaan arvioida jätevesien vaikutusta koko ekosysteemiin, olisi kalojen ohella käytettävä koe-eliöinä myös muita organismeja (esim. plankton, pohjaeläimet).

8. T I I V I S T E L M Ä

Tässä työssä tutkittiin kalojen käyttäytymismuutoksia ja positiivisen rheotaksisuuden menettämistä mittaavan automaattisen biologisen veden laadun tarkkailulaitteiston toimivuutta ja soveltuvuutta äkillisten myrkkypäästöjen havaitsemiseen laboratorio-oloissa. Samalla seurattiin äkillisten myrkkypäästöjen aiheuttamaa kalojen hengitysfrekvenssien muuttumista. Työ tehtiin vesihallituksen Ky-läsaaren kalalaboratoriossa huhti - elokuussa 1978.

Tarkkailulaitteisto koostuu kolmen rinnakkaisen osa-altaan ja kahden päätyaltaan muodostamasta allasjärjestelmästä, elektronisesta ohjaus- ja tulostusyksiköstä sekä ruokinta-automaatista, jota ei käytetty tässä työssä. Tarkkailulaitteistossa kirjolohet ilmentävät veden laadun äkillisiä muutoksia tulemalla levottomiksi ja pakenemalla läpivirtausaltaan takaosaan. Myös kalan kunnan heikkeneminen aiheuttaa kalan joutumisen altaan takaosaan. Laitteisto rekisteröi kalojen altaan takaosassa käyntien määrän sekä altaan takaosaan ajelehtivat kuolleet kalat. Laboratoriokokeissa veden laadun äkilliset muutokset saatiin aikaan sinkki- ja kuparisulfaattilisäyksillä. Sinkki ja kupari aiheuttavat myös kalojen hengitysfrekvenssien suurenemista, mitä seurattiin visuaalisesti. Myös kalojen käyttäytymisen jatkuva visuaalinen tarkkailu oli välttämätöntä luotettavien tulosten saamiseksi. Kalojen reagoimista seurattiin kussakin kokeessa kahden tunnin ajan. Yhteensä tehtiin 20 erillistä koetta.

Koetta edeltävänä päivänä seurattiin kalojen käyttäytymistä kuvaavia mittaustantureiden pulssimääriä ja mitattiin kalojen hengitysfrekvenssejä vertailuaineiston saamiseksi. Kalojen reagoiminen koetilanteessa veden laadun äkilliseen muutokseen ilmeni normaali-oloissa mitattujen arvojen ylittymisenä. Hälyttävänä veden laadun muutoksena pidettiin tilannetta, jolloin vähintään kaksi kolmesta koekalasta reagoi saman mittausjakson aikana.

Tarkkailulaitteistossa ilmeni laboratoriossa lukuisia toimintahäiriöitä: häiriöitä havaittiin 48 vuorokautena sadasta. Ennen laitteiston maastokäyttöön ottoa on sen toimintavarmuutta parannettava ja tehtävä siihen useita sähköteknisiä muutoksia. Muutosten jäl-

keen laitteisto on testattava uudelleen laboratoriossa.

Alhaisin sinkkipitoisuus, jossa kalojen käyttäytymismuutoksia mittaava laitteisto rekisteröi veden laadun hälyttävän muutoksen, oli $3,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$. Vastaava kuparipitoisuus oli $1,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. Pitoisuus $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ sinkkiä tai kuparia aiheutti hengitysfrekvenssien suurenemiseen perustuvan hälytyshavainnon. Yleensä kalat näyttivät havaitsevan jo pienimmän kokeissa käytetyn myrkkypitoisuuden $0,1 \text{ mg l}^{-1}$, mutta laitteisto ei rekisteröinyt tätä lievää levottomuutta.

Kalat hälyttivät äkillisen veden laadun muutoksen joko välittömästi myrkkylisäyksen jälkeen tai vähitellen myrkyvaikutuksen edetessä. Yleensä hälytys saatiin sekä hengitysfrekvenssien suurenemisen että käyttäytymismuutosten perusteella tunnin kuluessa. Pulssimäärät ylittivät hälytysrajan usein vain yhdellä mittausjaksolla kun taas hengitysfrekvenssit suurenivat kokeen aikana vähitellen ja pysyivät normaalia suurempina usean mittausjakson ajan.

Kalat eivät pystyneet hälyttämään pulssimäärien eivätkä yleensä hengitysfrekvenssienkään suurenemisen perusteella kahden tai yhden tunnin välein moninkertaistettuja suuria sinkki- tai kuparipitoisuuksia. Poikkeuksena oli kuparipitoisuuden kymmenkertaistamisen ($1,0 \rightarrow 10,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$) aiheuttama hälytys vähän ennen kalojen kuolemista.

Kalat eivät aina kyenneet havaitsemaan uudelleen alkuperäistä pitoisuutta hieman suurempaa sinkki- tai kuparipitoisuutta $1/2 - 1^{1/2}$ vuorokauden toipumisajan jälkeen. Myös noin kolmen viikon pituinen altistus pienelle sinkkipitoisuudelle ($0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$) heikensi kalojen reagoimiskykyä.

Kokeissa havaittiin ajoittain suuria eroja kalojen reagoimisnopeuksissa ja -voimakkuuksissa. Etenkin käyttäytymiserot olivat suuria. Kalat käyttäytyivät kokeissa kuitenkin vähemmän yksilöllisesti kuin normaalioloissa.

Tässä tutkimuksessa käytetty tarkkailulaitteisto vaatii vielä kehittämistä ennen kuin sen käyttökelpoisuus äkillisten myrkkypäästöjen havaitsemiseen voidaan lopullisesti arvioida. Tarkkailulaitteiston

kehittämisen lisäksi olisi tutkittava muiden, esimerkiksi hengitysaktiivisuuden mittaamiseen perustuvien menetelmien soveltuvuutta veden laadun valvontaan.

K I R J A L L I S U U S

- APHA-AWWA-WPCF 1975. Standard methods for the examination of water and wastewater. p. 845-872. 14th Ed. Washington.
- BALL, I.R. 1967 a. The relative susceptibilities of some species of fresh-water fish to poisons. I. Ammonia. Water Research 1:767 - 775.
- 1967 b. II. Zinc. Water Research 1: 777 - 783.
- 1967 c. Short communication. The toxicity of cadmium to rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Water Research 1: 805 - 806.
- BENGTSSON, B-E. 1974. Effects of zinc on the movement pattern of the minnow, Phoxinus phoxinus L. Water Research 8: 829 - 833.
- BESCH, W.K., JUHNKE, I. & KEMBALL, A. 1972. Zur Standardisierung des Fischwarntestes. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. 37: 31- 37.
- KEMBALL, A., MEYER-WAARDEN, K. & SCHARF, B. 1977. A biological monitoring system employing rheotaxis of fish. Cairns, J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p. 56 - 74. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.

BROWN, V.M. 1968. The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. Water Research 2: 723 - 733.

- 1976. Advances in testing the toxicity of substances to fish. Chemistry and Industry, 21 Feb. p. 143 - 149.
- & DALTON, R.A. 1970. The acute lethal toxicity to rainbow trout of mixtures of copper, phenol, zinc and nickel. J. Fish. Biol. 2: 211 - 216.
- JORDAN, D.H.M. & TILLER, B.A. 1967: The effect of temperature on the acute toxicity of phenol to rainbow trout in hard water. Water Research 1: 587 - 594.

BRUNGS, W.A. 1973: Continuous-flow bioassay with aquatic organisms: Procedures and applications. Cairns, J., Jr. & Dickson, K.L. (eds.): Biological methods for the assessment of water quality. p. 117 - 126. American Society for Testing and Materials. STP 528. Baltimore.

CAIRNS, J., Jr., DICKSON, K.L., SPARKS, R.E. & WALLER, W.T. 1970. A preliminary report on rapid biological information systems for water pollution control. J.WPCF 42: 685 - 703.

- HALL, J.W. MORGAN, E.L., SPARKS, R.E., WALLER, W.T. & WESTLAKE, G.F. 1973. The development of an automated biological monitoring system for water quality. Bull. 59, Feb. 1. 50 p. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg.

CARLSON, R.W. & DRUMMOND, R.A. 1978. Fish cough response - a method for evaluating quality of treated complex effluents. Water Research 12: 1 - 6.

CHICAGO MINIATURE LAMP WORKS 1975. Catalogue. 33 p.

CRANDALL, C.A. & GOODNIGHT, C.J. 1962. Effects of sublethal concentration of several toxicants on growth of the common guppy, Lebistes reticulatus. Limnol. Oceanogr. 7: 233 - 239.

CUMMINGS, W.C. 1963. Using the Doppler effect to detect movements of captive fish in behavior studies. Trans. Amer. Fish. Soc. 92: 178 - 180.

DAVIS, J.C. & CAMERON, J.N. 1970. Water flow and gas exchange at the gill of rainbow trout, Salmo gairdneri. J. exp. Biol. 54: 1 - 18.

DOUDOROFF, P. 1977. Keynote address - reflections on pickle-jar ecology. Cairns J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p 3-19. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.

EATON, J.G. 1974. Chronic cadmium toxicity to the bluegill (Lepomis macrochirus Rafinesque). Trans. Amer. Fish. Soc. 103: 729 - 735.

- 1975. Recent developments in the use of laboratory bioassays to determine "safe" levels of toxicants for fish. Glass, G.E. (ed.): Bioassay techniques and environmental chemistry. p. 107 - 115. EPA. Ann Arbor Sc. Publ. Ann Arbor.

EIFAC, EUROPAEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION 1975. Report on fish toxicity testing procedures. FAO/EIFAC. Tech. Paper 24. 25p. Rome.

FALK, D.L. & DUNSON, W.A. 1977. The effects of season and acute sub-lethal exposures on survival times of brook trout at low pH. Water Research 11: 13 - 15.

FOLMAR, L.C. 1976. Overt avoidance reaction of rainbow trout fry to nine herbicides. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 15: 509 - 514.

- GRANDE, M. 1978. Toksicitetstester med fisk. En generell översikt. Nordforsk. Miljövårdssekr. Publ. 2: 213 - 224.
- HARA, T.J., LAW, Y.M.C. & Mac DONALD, S. 1976. Effects of mercury and copper on the olfactory response in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. J. Fish. Res. Board Can. 33: 1568 - 1573.
- HASSELROTH, T.B. 1975: Bioassay methods of the National Swedish Environmental Protection Board. J. WPCF 47: 851 - 856.
- HEATH, A.G. 1972. A critical comparison of methods for measuring fish respiratory movements. Water Research 6: 1-7.
- HERBERT, D.W.M. & DYKE, J.M. van. 1964. The toxicity to fish of mixtures of poisons - II. Copper-ammonia and zinc-phenol mixtures. Ann. appl. Biol. 53: 415 - 421.
- & MERKENS, J.C. 1952. The toxicity of potassium cyanid to trout. J. exp. Biol. 29: 632 - 649.
- & MERKENS, J.C. 1961. The effect of suspended mineral solids on the survival of trout. Int. J. Air Wat. Pollut. 5: 46 - 55. (Ref Sprague, J.B. 1971).
- & SHURBEN, D.S. 1963. A preliminary study of the effect of physical activity on the resistance of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to two poisons. Ann. appl. Biol. 52: 321 - 326.
- & WAKEFORD, A.C. 1964. The susceptibility of salmonid fish to poisons under estuarine conditions - I. Zinc sulphate. Int. J. Air Wat. Pollut. 8: 251 - 256. (Ref. Sprague, J.B. 1970).
- HORNING, W.B. 1977. Research related to biological evaluation of complex wastes. Cairns J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p 191 - 199. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.

- HUGHES, G.M. & ROBERTS, J.L. 1970. A study of the effect of temperature changes on the respiratory pumps of the rainbow trout. J. exp. Biol. 52: 177 - 192.
- & SAUNDERS, R.L. 1970. Responses of the respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. exp. Biol. 52: 529 - 545.
- HÖGLUND, L.B. & OLSEN, H. 1978. Inverkan av miljöfrämmande substanser på luktattraktion hos röding. Beteendetest för bedömning av xenobiotikas interferens med fiskars kemiska signalsystem. Nordforsk. Miljövårdssekr. Publ. 2: 289-302.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 1978. Preliminary proposal for a standard method for screening chemicals and products for acute toxicity to freshwater fish. Mimeogr. 15 p.
- JENSEN, A.L. 1972. Standard error of LC50 and sample size in fish bioassays. Water Research 6: 85 - 89.
- JONES, J.R.E. 1964. Fish and river pollution. 203 p. London.
- JUNG, K.D. 1973. Extrem fishtoxische Substanzen und ihre Bedeutung für ein Fischtest-Warnsystem. GWF Wasser/Abwasser 114: 232 - 234.
- KANWISHER, J., LAWSON, K. & SUNDNES, G. 1974. Acoustic telemetry from fish. Fish. Bull. 72: 251 - 255.
- KASURINEN, E. 1969. Valaistustekniikka. Sihvo, L. (toim.): Tekniikan käsikirja. p. 751 - 780. 3. osa. Jyväskylä.
- KATZ, M. 1971. Toxicity bioassay techniques using aquatic organisms. Ciaccio, L.L. (ed.): Water and water pollution handbook 2. p. 763 - 800. New York.
- KIWA, KEURINGSINSTITUT VOOR WATERLEIDINGARTIKELEN 1977. Biological monitoring system. Mimeogr. 23 p.

- KLEEREKOPER, H. 1977. Some monitoring and analytical techniques for the study of locomotor responses of fish to environmental variables. Cairns J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p. 110 - 120. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.
- KOLI, L. 1973. Retkeilijän kalaopas. 127 p. Keuruu.
- LAAKSONEN, R. 1969. Vesistöjen veden laadusta 1962 - 1968. Vesien-suojelutoimiston tiedonantoja 47. 512 p. Helsinki.
- LAALE, H.W. 1977: The biology and use of zebrafish Brachydanio rerio in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121 - 173.
- LEMKE, A.E. & MOUNT, D.I. 1963. Some effects of alkyl benzene sulfonate on the bluegill Lepomis macrochirus. Trans. Amer. Fish. Soc. 92: 372 - 378.
- LIEBMANN, M. 1960. Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie II. p. 679 - 974. München.
- LINDAHL, P.E., OLOFSSON, S. & SCHWANBOM, E. 1977. Rotatory-flow technique for testing fitness of fish. Cairns, J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p. 75 - 84. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.
- LLOYD, R. 1960. The toxicity of zinc sulfate to rainbow trout. Ann. appl. Biol. 48: 84 - 94.
- 1961 a. The toxicity of mixtures of zinc and copper sulphates to rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Ann. appl. Biol. 49: 535 - 538.
- 1961 b. Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). J. exp. Biol. 38: 447 - 455.

- LOWE, J.I. 1964. Chronic exposures of spot, Leiostomus xanthurus, to sublethal concentrations of toxaphene in seawater. Trans. Amer. Fish. Soc. 93: 396 - 399.
- McKIM, J.M. & BENOIT, D.A. 1971. Effects of long-term exposures to copper on survival, growth and reproduction of brook trout (Salvelinus fontinalis). J.Fish. Res. Board Can. 28: 655 - 662.
- Mac LEOD, J.C. & SMITH, L.L., Jr. 1966. Effect of pulpwood fiber on oxygen consumption and swimming endurance of the fathead minnow, Pimephales promelas. Trans. Amer. Fish. Soc. 95: 71 - 84.
- MARVIN, D.E. & HEATH, A.G. 1968. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of fresh-water fish. Comp. Biochem. Physiol. 27: 349-355.
- MEFFERT, P. 1968. Ultrasonic recorder for locomotor activity studies. Trans. Amer. Fish. Soc. 97: 12 - 17.
- 1971. A further contribution to using ultrasonic sensor for fish activity studies. Trans. Amer. Fish. Soc. 4: 793 - 794.
- MIETTINEN, V. 1975. Vesistöjen myrkkynuormituskapasiteetti. Ympäristö ja Terveys 2: 107 - 112.
- MORGAN, E. 1972. Biologically monitoring simulated changes in water quality employing fish swimming activity as sensors. 179 p. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg.
- MORGAN, W.S.G. 1977. An electronic system to monitor the effects of changes in water quality on fish opercular rhythms. Cairns, J., Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p. 38 - 55. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.

- MORGAN, W.S.G & KÜHN, P.C. 1974. A method to monitor the effects of toxicants upon breathing rate of Largemouth Bass (Micropterus salmoides Lacépède). Water Research 8: 67-77.
- MOUNT, D.I. 1968. Chronic toxicity of copper to fathead minnows (Pimephales promelas Rafinesque). Water Research 2: 215 - 223.
- & STEPHAN, C.E. 1967. A method for establishing acceptable toxicant limits for fish - malathion and the butoxyethanol ester of 2,4-D. Trans. Amer. Fish. Soc. 96: 185 - 193.
- & STEPHAN, C.E. 1969. Chronic toxicity of copper to the fathead minnow (Pimephales promelas) in soft water. J. Fish. Res. Board Can. 26: 2449 - 2457.
- MUIR, B.S., NELSON, G.J. & BRIDGES, K.W. 1965. A method for measuring swimming speed in oxygen consumption studies on the aholehole Kuhlia sanduicensis. Trans. Amer. Fish. Soc. 94: 378 - 382.
- MYRKKYLAKE. Suomen asetuskokoelma 309/1969.
- O'HARA, J. 1971. Alterations in oxygen consumption by bluegills exposed to sublethal treatment with copper. Water Research 5: 321 - 327.
- PATRICK, R., CAIRNS, J. & SCHEIER, A. 1968. The relative sensitivity of diatoms, snails and fish to 20 common constituents of industrial wastes. Progr. Fish.-Cult. 30: 137 - 140.
- PICKERING, Q.H. 1968. Some effects of dissolved oxygen concentrations upon the toxicity of zinc to the bluegill, Lepomis macrochirus Raf. Water Research 2: 187 - 194.
- PIPPY, O.H.C. & HARE, G.M. 1969. Relationship of river pollution to bacterial infection in salmon (Salmo salar) and suckers (Catostomus commersoni). Trans. Amer. Fish. Soc. 98:685-690.

- POELS, C.L.M. 1975. Continuous automatic monitoring of surface water with fish. *Wat. Treat. Exam.* 24: 46 - 56.
- 1977. An automatic system for rapid detection of acute high concentrations of toxic substances in surface water using trout. Cairns, J., Jr. ym. (eds.): *Biological monitoring of water and effluent quality.* p. 85 - 95. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.
- REYNOLDS, W.W. 1977. Fish orientation behavior: An electronic device for studying simultaneous responses to two variables. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 300 - 308.
- ROBINSON, G.R., DUNSON, W.A., WRIGHT, J.E. & MAMOLITO, G. 1976. Differences in low pH tolerance among strains of brook trout (Salvelinus fontinalis), *J. Fish. Biol.* 8:5-17.
- ROTHSCHEIN, J. 1964. Einige kritische Betrachtungen zum Thema "toxikologische Experimente und höchstzulässige Konzentrationen von Giftstoffen im Wasser". *Sbornik Vysoké školy chemickotechnologické. v Praze, Technologie vody* 8: 303 - 325. (Ref. Sprague, J.B. 1970).
- SALMELA, K. 1978. Biologisen tarkkailun kokeilu Kymi-joella. *Vesihallituksien tiedotus* 148. 121 p. Helsinki.
- SAUNDERS, R.L. & SPRAGUE, J.B. 1967. Effects of copper-zinc mining pollution on a spawning migration of Atlantic salmon. *Water Research* 1: 419 - 432.
- SAUTER, S., BUXTON, K.S., MACEK, K.J. & PETROCELLI, S.R. 1976. Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish. Toxicity of copper, cadmium, chromium and lead to eggs and fry of seven fish species. EPA-600/3-76-105. 75 p.

- SELLERS, C.M., Jr., HEATH, A.G. & BASS, M.L. 1975. The effect of sublethal concentrations of copper and zinc on ventilatory activity, blood oxygen and pH in rainbow trout (Salmo gairdneri). Water Research 9: 401 - 408.
- SEPPOVAARA, O. 1977. Kalojen lisääntymisedellytykset metsäteollisuuden voimakkaasti likaamassa Kymijoen yläosassa. Ympäristö ja Terveys 8: 701 - 707.
- SHELTON, G. & RANDALL, D.J. 1962. The relationship between heart beat and respiration in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 3: 237 - 250.
- SHIRER, H.W., CAIRNS, J., Jr. & WALLER, W.T. 1968. A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. Water Resources Bull. 4: 27 - 43.
- SOLBE, J.F. de L.G. & COOPER, V.A. 1976. Studies on the toxicity of copper sulphate to stone loach Noemacheilus barbatulus (L.) in hard water. Water Research 10: 523 - 527.
- SPARKS, R.E., CAIRNS, J., Jr. & HEATH, A.G. 1972. The use of bluegill breathing rates to detect zinc. Water Research 6: 895 - 911.
- SPEHAR, R.L. 1976. Cadmium and zinc toxicity to flagfish, Jordanella floridae. J. Fish. Res. Board Can. 33: 1939 - 1945.
- SPOOR, W.A., NEIHEISEL, T.W. & DRUMMOND, R.A. 1971. An electrode chamber for recording respiratory and other movements of free-swimming animals. Trans. Amer. Fish. Soc. 1: 22 - 28.
- SPRAGUE, J.B. 1968. Promising anti-pollutant: chelating agent NTA protects fish from copper and zinc. Nature, Lond. 220: 1345 - 1346.
- 1969. Review paper. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. Water Research 3: 793 - 821.

- SPRAGUE, J.B. 1970. II. Utilizing and applying bioassay results. Water Research 4: 3 - 32.
- 1971. III. Sublethal effects and "safe" concentrations. Water Research 5: 245 - 266.
- 1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish. Cairns, J., Jr. Dickson, K.L. (eds.): Biological methods for the assessment of water quality. p. 6-30. American Society for Testing and Materials. STP 528. Baltimore.
- 1976. Current status of sublethal tests of pollutants on aquatic organisms. J. Fish. Res. Board Can. 33. 1988-1992.
- & DRURY, D.E. 1969. Avoidance reactions of salmonid fish to representative pollutants. Advances in Water Pollution Research, Proc. Fourth Internat. Conf., held in Prague, 1969. p. 169 - 179 Vol. 1. Pergamon Press. Oxford. (Ref. Sprague, J.B. 1971).
- TARZWELL, C.M. 1962. The need and value of water quality criteria with special reference to aquatic life. Can. Fish. Cult. 31: 35 - 41.
- VIBERT, R. (ed.) 1967. Fishing with electricity. Its application to biology and management. 276 p. European Inland Fisheries Advisory commission. FAO, Fishing News (Books). Rome.
- WALDEN, C.C. 1976. Review paper. The toxicity of pulp and paper mill effluents and corresponding measurement procedures. Water Research 10: 639 - 664.
- WALDICHUK, M. 1974. Some biological concern in heavy metals pollution. Vernberg F.J. & Vernberg W.B. (eds.): Pollution and physiology of marine organisms. p. 1 - 57. Academic Press. New York, San Fransisco, London.

- WALLER, W.T. & CAIRNS, J., Jr. 1972. The use of fish movement patterns to monitor zinc in water. Water Research 6: 257 - 269.
- WARREN, C.E., 1971. Biology and water pollution control. 434 p. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto.
- & DAVIS, G.E. 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth of fish. Gerkin, S.D. (ed.): The biological basis of freshwater fish production. p. 175 - 214. Blackwell Scientific Publ. Oxford. (Ref. Sprague, J.B. 1971).
- WESTLAKE, G.F. & SCHALIE, W.H. van der. 1977. Evaluation of an automated biological monitoring system at an industrial site. Cairns, J. Jr. ym. (eds.): Biological monitoring of water and effluent quality. p. 30 - 37. American Society for Testing and Materials. STP 607. Baltimore.
- ZAHNER, R. 1962. Über die Wirkung von Treibstoffen und Ölen auf Regenbogenforellen. Vom Wasser 29: 142 - 177.

Eräiden aineiden myrkyllisyys kaloille ja nisäkkäille
(C.L.M. Poels, kirjeell. tied. 20.3.1978).

| model experiments with monitoring system using rainbow trout | | | | Fish toxicity | Mammalian toxicity | |
|--|--------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|--|
| toxic substance | dose mg/l | time till first alarm (hrs) | time till death (hrs) | TLm 96 hrs mg/l | LD50 rat, oral mg/kg | acute toxic dose for humans of 70 kg, drinking 2,5 l water per day in mg/kg |
| CuSO_4 | 1,5 | 2,5 | 13 | 8 | 300 | 8400 |
| HgCl_2 | 1,0 | 29 | 30 | 0,4 | 37 | 1000 |
| Na_2SeO_3 | 100 | 4 | 16 | 55 | 7 | 200 |
| Lindane | 0,06 | 0,75 | 6 | 0,077 | 76 | 2100 |
| KCN^x | 0,5 | 0,5 | 1,25 | 0,43 | 10 | 280 |
| Carbaryl ^x | 1,5 | 4 | 6 | 11,5 | 89 | 2500 |

x Experiments performed by Dr. F. van Hoof, Antwerp Waterworks

LIITE 2

Koekalojen pituudet ja painot.

| Kokeen n:o | pituus (cm) | | | paino (g) | | |
|------------|-------------|------|------|-----------|-------|-------|
| | kala 1 | 2 | 3 | kala 1 | 2 | 3 |
| 1 | 17,5 | 19,5 | 17,5 | 63,8 | 75,1 | 53,7 |
| 2 | 19,0 | 19,0 | 19,0 | 59,6 | 76,8 | 62,8 |
| 3 | 20,0 | 17,5 | 19,0 | 89,3 | 56,2 | 54,1 |
| 4 | 17,0 | 18,0 | 18,0 | 48,0 | 66,0 | 51,3 |
| 5 | 17,0 | 18,0 | 18,0 | 48,0 | 66,0 | 51,3 |
| 6 | 19,5 | 19,5 | 20,0 | 73,3 | 66,3 | 87,0 |
| 7 | 19,0 | 21,0 | 19,0 | 82,4 | 92,4 | 89,0 |
| 8 | 22,0 | 23,0 | 19,0 | 97,0 | 104,1 | 62,5 |
| 9 | 22,0 | 23,0 | 19,0 | 97,0 | 104,1 | 62,5 |
| 10 | 23,0 | 21,0 | 23,0 | 93,6 | 80,4 | 114,0 |
| 11 | 23,0 | 21,0 | 24,0 | 94,6 | 80,4 | 114,0 |
| 12 | 21,5 | 23,0 | 22,0 | 100,0 | 108,0 | 103,2 |
| 13 | 22,0 | 22,0 | 23,0 | 86,9 | 102,6 | 116,2 |
| 13 | 22,0 | 22,0 | 23,0 | 86,9 | 102,6 | 116,2 |
| 14 | 23,0 | 22,0 | 21,5 | 125,4 | 95,0 | 86,5 |
| 15 | 21,5 | 21,5 | 22,0 | 75,0 | 103,4 | 120,2 |
| 16 | 19,5 | 23,5 | 20,5 | 83,4 | 99,7 | 87,7 |
| 17 | 23,5 | 24,0 | 24,0 | 141,0 | 111,7 | 136,9 |
| 18 | 23,5 | 23,0 | 24,0 | 141,0 | 111,7 | 136,9 |
| 19 | 23,5 | 23,0 | 24,0 | 138,4 | 129,6 | 132,0 |
| 20 | 25,0 | 24,0 | 24,0 | 177,9 | 139,8 | 148,6 |

Kokeen 1 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|-----|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 3.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 2 | 0 | 1 | 15 | 40 | 17 | 86 |
| 3 | 1 | 0 | 30 | 43 | 15 | 53 |
| (11) | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 2 |
| 0 | 1 | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 90 | 2 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | 105 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 120 | 4 | 0 | 0 |
| 0 | (3) | 0 | | 6.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 2 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 14 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 2 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 4 | | 9.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | (17) | | | | |
| 0 | 0 | 5 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 16 | 30 | 0 | 0 | 16 |
| 0 | 0 | 4 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 60 | 0 | 0 | 0 |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 80 | (88) | 62 | | 3.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 64 | 82 | 64 | 0 | 78 | 70 | 72 |
| 76 | 68 | 66 | 5 | 100 | 108 | 98 |
| 80 | 78 | 66 | 15 | 88 | 108 | 96 |
| 74 | 66 | 60 | 30 | 88 | 96 | 82 |
| 80 | 68 | 62 | 45 | 80 | 84 | 76 |
| 72 | 72 | (84) | 60 | 76 | 86 | 80 |
| 76 | 76 | 80 | 90 | 86 | 88 | 82 |
| 78 | 78 | 68 | 120 | 82 | 84 | 80 |
| (84) | 64 | 84 | | 6.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | | | | |
| | | | 5 | 108 | 88 | 114 |
| | | | 15 | 100 | 88 | 114 |
| | | | 30 | 108 | 112 | 130 |
| | | | 45 | 108 | 112 | 128 |
| | | | 60 | 108 | 112 | 130 |
| | | | | 9.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | | | | |
| | | | 5 | 100 | 104 | 118 |
| | | | 15 | 104 | 102 | 134 |
| | | | 30 | 104 | 102 | 126 |
| | | | 45 | 100 | 104 | 130 |
| | | | 60 | 104 | 104 | 132 |

LIITE 4

Kokeen 2 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 0.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 33 | 10 |
| 0 | 0 | 1 | 30 | 27 | 18 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 35 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 30 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 75 | 24 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 90 | 25 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 6 | 105 | 18 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 7 | 120 | 7 | 0 | 0 |
| 0 | 7 | 0 | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 5 | 11 | 3 | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 16 | (29) | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 24 | 0 | 30 | 3 | 0 | 0 |
| 19 | 2 | 11 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 7 | 60 | 14 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | (29) | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| (44) | 0 | 19 | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 4 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 30 | 4 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 3 | 0 | 0 |
| | | | 60 | 12 | 0 | 0 |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 64 | (68) | (70) | | 0.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 56 | 68 | 60 | 0 | 64 | 64 | 60 |
| 50 | 62 | 64 | 5 | 90 | 74 | 64 |
| 54 | 64 | 64 | 15 | 88 | 82 | 86 |
| 56 | 64 | 64 | 30 | 84 | 72 | 72 |
| (84) | 68 | 58 | 45 | 80 | 74 | 76 |
| 60 | 60 | 62 | 60 | 76 | 68 | 78 |
| 72 | 66 | 56 | 90 | 68 | 62 | 70 |
| 62 | 60 | 56 | 120 | 68 | 64 | 72 |
| 52 | 60 | 58 | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | 5 | 70 | 72 | 70 |
| | | | 15 | 60 | 62 | 66 |
| | | | 30 | 58 | 66 | 72 |
| | | | 45 | 58 | 66 | 72 |
| | | | 60 | 58 | 68 | 72 |
| | | | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| | | | 5 | 68 | 82 | 78 |
| | | | 15 | 68 | 68 | 74 |
| | | | 30 | 68 | 70 | 74 |
| | | | 45 | 68 | 68 | 74 |
| | | | 60 | 68 | 70 | 74 |

Kokeen 3 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|---|---|------------------------|------|---|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

10 0 10 0.1 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

2 2 0 15 8 6 22

8 0 0 30 0 0 9

0 0 0 45 0 0 0

9 0 0 60 0 0 0

3 0 0 75 0 0 0

0 0 2 90 0 0 0

6 0 3 105 0 0 0

8 0 3 120 0 0 0

25 0 5

11 0 7 0.2 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

0 0 7 15 0 0 0

0 (25) 8 30 0 0 0

3 4 2 45 0 0 0

13 6 4 60 0 0 0

6 4 (13)

(26) 4 9 0.4 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

0 10 5 15 0 5 15

0 10 2 30 0 0 0

0 0 0 45 10 0 7

60 0 0 0

4.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

15 1 1 2

30 8 0 0

45 10 0 0

60 0 0 0

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|---|---|------------------------|------|---|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

(76) (76) 60 0.1 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

70 70 52 0 54 54 54

70 72 56 5 72 66 66

70 70 52 15 72 66 54

70 70 52 30 54 54 54

70 64 (72) 45 64 54 54

52 70 56 60 62 54 54

54 54 54 90 62 54 56

56 54 52 120 62 54 54

54 56 54

0.2 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

5 60 58 52

15 66 62 54

30 60 62 46

45 60 62 46

60 60 60 52

0.4 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

5 80 60 78

15 72 56 52

30 64 56 50

45 68 52 50

60 68 52 48

4.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$

5 78 52 52

15 64 54 50

30 78 60 50

45 76 64 54

60 66 60 46

LIITE 6.

Kokeen 4 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 4 | 0 | 3 | | 0.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 6 | 0 | 0 | 15 | 153 | 23 | 9 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 65 | 14 | 4 |
| 0 | 3 | 0 | 45 | 40 | 5 | 7 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | 7 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 75 | 3 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 3 | 90 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 10 | 4 | 105 | 0 | 22 | 0 |
| (33) | 0 | 0 | 120 | 0 | 10 | 0 |
| 2 | 3 | 0 | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 3 | 7 | 1 | | | | |
| 8 | 8 | (19) | 15 | 19 | 3 | 0 |
| 11 | 5 | 18 | 30 | 0 | 29 | 0 |
| 0 | 3 | 1 | 45 | 9 | 11 | 0 |
| 2 | (28) | 0 | 60 | 0 | 14 | 0 |
| 0 | 25 | 9 | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 13 | 0 | 0 | | | | |
| 24 | 14 | 0 | 15 | 26 | 15 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 25 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 45 | 0 | 23 | 0 |
| | | | 60 | 0 | 44 | 0 |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|--|--|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | |
| 80 | 72 | (88) | | 0.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | | | |
| 68 | 66 | 80 | 0 | 82 | 74 | 84 | | |
| 84 | 66 | 80 | 5 | 120 | 80 | 94 | | |
| 72 | 66 | 76 | 15 | 108 | 80 | 90 | | |
| 74 | 68 | 76 | 30 | 86 | 80 | 90 | | |
| (90) | 76 | 84 | 45 | 80 | 76 | 92 | | |
| 78 | 76 | 84 | 60 | 54 | 70 | 80 | | |
| 64 | (86) | 86 | 90 | 58 | 64 | 84 | | |
| 68 | 86 | 84 | 120 | 74 | 64 | 80 | | |
| 80 | 84 | 84 | | 1.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | | | |
| | | | 5 | 62 | 68 | 88 | | |
| | | | 15 | 62 | 68 | 86 | | |
| | | | 30 | 58 | 66 | 84 | | |
| | | | 45 | 60 | 68 | 84 | | |
| | | | 60 | 58 | 66 | 84 | | |
| | | | | 1.5 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | | | |
| | | | 5 | 56 | 72 | 80 | | |
| | | | 15 | 56 | 70 | 80 | | |
| | | | 30 | 56 | 66 | 82 | | |
| | | | 45 | 60 | 66 | 82 | | |
| | | | 60 | 66 | 68 | 84 | | |

Kokeen 5 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|---|---|------------------------|---------------|---|---|
| normaalioloissa | | | koe- aika (min.) | kokeen aikana | | |
| kala | | | | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

| | | | | | | |
|------|------|------|-----|---------------------------------------|---|---|
| 4 | 0 | 3 | | 0.5 mg ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 6 | 0 | 0 | 15 | 102 | 7 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 40 | 2 | 0 |
| 0 | 3 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 3 | 90 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 10 | 4 | 105 | 0 | 0 | 0 |
| (33) | 0 | 0 | 120 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 3 | 0 | | | | |
| 3 | 7 | 1 | | | | |
| 8 | 8 | (19) | | | | |
| 11 | 5 | 18 | | | | |
| 0 | 3 | 1 | | | | |
| 2 | (28) | 0 | | | | |
| 0 | 25 | 0 | | | | |
| 13 | 0 | 0 | | | | |
| 24 | 14 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 3 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|---|---|------------------------|---------------|---|---|
| normaalioloissa | | | koe- aika (min.) | kokeen aikana | | |
| kala | | | | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

| | | | | | | |
|------|------|------|-----|---------------------------------------|----|----|
| 80 | 72 | (88) | | 0.5 mg ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 68 | 66 | 80 | 0 | 80 | 80 | 80 |
| 84 | 66 | 80 | 5 | 90 | 66 | 80 |
| 72 | 66 | 76 | 15 | 88 | 66 | 80 |
| 74 | 68 | 76 | 30 | 60 | 60 | 84 |
| (90) | 76 | 84 | 45 | 66 | 64 | 80 |
| 78 | 76 | 84 | 60 | 64 | 62 | 80 |
| 64 | (86) | 86 | 90 | 64 | 64 | 76 |
| 68 | 86 | 84 | 120 | 66 | 66 | 78 |
| 80 | 84 | 84 | | | | |

LIITE 8

Kokeen 6 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/min. | | | | | | |
|------------------|------|------|------------------------|---------------------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 2.0 mg ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 26 | 18 | 14 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 2 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 0 | 2 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 15 | 0 | 4 |
| 0 | 0 | 7 | 75 | 12 | 0 | 0 |
| 0 | 2 | 4 | 90 | 0 | 9 | 2 |
| 0 | 0 | 6 | 105 | 0 | 16 | 8 |
| 2 | 0 | 12 | 120 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 13 | | | | |
| 2 | 6 | 0 | | | | |
| (13) | 0 | 5 | | | | |
| 10 | 4 | 3 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 18 | 11 | | | | |
| 0 | 0 | 7 | | | | |
| 0 | 1 | (16) | | | | |
| 0 | (20) | 15 | | | | |
| 0 | 12 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|---------------------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 60 | 76 | 60 | | 2.0 mg ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 62 | 68 | 60 | 0 | 58 | 76 | 66 |
| 62 | 66 | 64 | 5 | 64 | 76 | 66 |
| 64 | 66 | 62 | 15 | 64 | 68 | 58 |
| 56 | 66 | 60 | 30 | 64 | 68 | 60 |
| (80) | (78) | 74 | 45 | 80 | 70 | 64 |
| 66 | 70 | 78 | 60 | 84 | 68 | 68 |
| 60 | 64 | 72 | 90 | 86 | 76 | 72 |
| 58 | 76 | 74 | 120 | 96 | 90 | 88 |
| 64 | 74 | (80) | | | | |

Kokeen 7 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|---|---|------------------------|------|---|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

| | | | | | | |
|----|----|----|-----|---|----|---|
| 0 | 0 | 0 | | 3.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 4 | 19 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 4 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 7 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 2 | 4 | 90 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 6 | 105 | 0 | 3 | 0 |
| 2 | 0 | 12 | 120 | 1 | 19 | 2 |
| 0 | 0 | 13 | | | | |
| 2 | 6 | 0 | | | | |
| 13 | 0 | 5 | | | | |
| 10 | 4 | 3 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 18 | 11 | | | | |
| 0 | 0 | 7 | | | | |
| 0 | 1 | 16 | | | | |
| 0 | 20 | 15 | | | | |
| 0 | 12 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|---|---|------------------------|------|---|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |

| | | | | | | |
|----|----|----|-----|---|----|----|
| 60 | 76 | 60 | | 3.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 62 | 68 | 60 | 0 | 48 | 60 | 66 |
| 62 | 66 | 64 | 5 | 56 | 64 | 68 |
| 64 | 66 | 62 | 15 | 54 | 76 | 64 |
| 56 | 66 | 60 | 30 | 48 | 68 | 60 |
| 80 | 78 | 74 | 45 | 46 | 64 | 60 |
| 66 | 70 | 78 | 60 | 60 | 64 | 62 |
| 60 | 64 | 72 | 90 | 66 | 60 | 54 |
| 58 | 76 | 74 | 120 | 80 | 74 | 58 |
| 64 | 74 | 80 | | | | |

LIITE 10

Kokeen 15 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|-----|------------------------|--|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 3.0 mgl ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 0 | 0 | 3 | 15 | 13 | 16 | 23 |
| 2 | 12 | (9) | 30 | 2 | 0 | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 1 | 0 | 2 |
| (9) | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | (15) | 0 | 75 | 2 | 16 | 15 |
| 0 | 1 | 0 | 90 | 0 | 14 | 11 |
| 5 | 0 | 0 | 105 | 5 | 0 | 15 |
| 0 | 3 | 8 | 120 | 2 | 16 | 4 |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 4 | 0 | 0 | | | | |
| 3 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|--|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| (64) | (66) | 76 | | 3.0 mgl ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 64 | 66 | 78 | 0 | 60 | 60 | 76 |
| 60 | 62 | (86) | 5 | 60 | 62 | 78 |
| 56 | 56 | 82 | 15 | 60 | 60 | 78 |
| 56 | 58 | 80 | 30 | 60 | 58 | 80 |
| 60 | 60 | 62 | 45 | 68 | 70 | 80 |
| 62 | 62 | 62 | 60 | 76 | 88 | 98 |
| 64 | 64 | 78 | 90 | 76 | 90 | 98 |
| 64 | 62 | 70 | 120 | 78 | 100 | 114 |
| 62 | 60 | 76 | | | | |

Kokeen 16 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|--|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 6 | 4 | 3 | | 10.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 6 | 2 | 1 | 15 | 16 | 4 | 26 |
| 0 | 0 | 2 | 30 | 20 | 17 | 21 |
| 0 | 0 | 2 | 45 | 3 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 6 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 4 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | 1 | 90 | 19 | 0 | 12 |
| 0 | (16) | 0 | 105 | 32 | 3 | 6 |
| 2 | 14 | 0 | 120 | 0 | 0 | 23 |
| 4 | 13 | 6 | | † | | |
| 2 | 2 | (12) | | | | |
| (10) | 0 | 2 | | | | |
| 0 | 0 | 8 | | | | |
| 0 | 7 | 7 | | | | |
| 0 | 0 | 2 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 2 | | | | |
| 4 | 8 | 0 | | | | |
| 7 | 5 | 5 | | | | |
| 2 | 0 | 12 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|--|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 86 | 66 | 68 | | 10.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| (98) | 70 | 64 | 0 | 82 | 66 | 87 |
| 86 | 70 | 62 | 5 | 82 | 62 | 70 |
| 80 | 80 | 70 | 15 | 122 | 64 | 78 |
| 98 | (86) | 70 | 30 | 120 | 72 | 90 |
| 92 | 72 | 70 | 45 | 120 | 100 | 98 |
| 96 | 64 | 88 | 60 | 122 | 108 | 108 |
| 86 | 76 | (90) | 90 | 122 | 104 | 118 |
| 86 | 72 | 72 | 120 | 122 | 116 | 112 |
| 82 | 66 | 86 | | | | |

LIITE 12

Kokeen 17 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 3.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | |
| 2 | 1 | 2 | 15 | 1 | 10 | 8 |
| 0 | 6 | 7 | 30 | 0 | 16 | 1 |
| 4 | (23) | 8 | 45 | 2 | 5 | 2 |
| 0 | 1 | 0 | 60 | 16 | 1 | 6 |
| 1 | 0 | 2 | 75 | 9 | 20 | 6 |
| 1 | 0 | 12 | 90 | 6 | 4 | 2 |
| 1 | 0 | (14) | 105 | 3 | 0 | 12 |
| 0 | 0 | 0 | 120 | 7 | 6 | 5 |
| 0 | 0 | 12 | | | | |
| 5 | 1 | 10 | | | | |
| 4 | 3 | 6 | | | | |
| (8) | 0 | 8 | | | | |
| 0 | 0 | 8 | | | | |
| 0 | 1 | 2 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 4 | 15 | 0 | | | | |
| 4 | 1 | 11 | | | | |
| 0 | 3 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|--|--|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | |
| (54) | (72) | 74 | | 3.0 mg l^{-1} Zn $^{2+}$ | | | | |
| 54 | 72 | 74 | 0 | 46 | 54 | 62 | | |
| 46 | 66 | 64 | 5 | 46 | 54 | 62 | | |
| 46 | 64 | 70 | 15 | 44 | 54 | 62 | | |
| 46 | 60 | (78) | 30 | 46 | 60 | 62 | | |
| 48 | 58 | 68 | 45 | 46 | 60 | 62 | | |
| 44 | 60 | 64 | 60 | 46 | 54 | 62 | | |
| 46 | 60 | 66 | 90 | 48 | 84 | 60 | | |
| 46 | 60 | 70 | 120 | 52 | 80 | 70 | | |
| 46 | 60 | 68 | | | | | | |

Kokeen 18 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min | | | | | | |
|--------------------|------|-----|------------------------|--|---|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 1 | | 10.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 0 | 3 | (2) | 15 | 2 | 0 | 7 |
| 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 4 |
| 0 | 1 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| (1) | 0 | 0 | 60 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 75 | 2 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 90 | 4 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 105 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 120 | 9 | 0 | 8 |
| 0 | 10 | 0 | | | | |
| 0 | (12) | 0 | | | | |
| 0 | 5 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 1 | 0 | | | | |
| 0 | 7 | 0 | | | | |
| 0 | 2 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 8 | 0 | | | | |
| 0 | 4 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|--|-----|-----|--|--|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | |
| 74 | 76 | (86) | | 10.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | | | |
| 78 | 70 | 76 | 0 | 72 | 62 | 80 | | |
| (82) | 66 | 72 | 5 | 82 | 66 | 92 | | |
| 78 | 60 | 78 | 15 | 80 | 68 | 82 | | |
| 76 | 64 | 74 | 30 | 122 | 94 | 90 | | |
| 80 | 66 | 70 | 45 | 124 | 96 | 90 | | |
| 76 | 66 | 74 | 60 | 134 | 100 | 122 | | |
| 72 | 66 | 76 | 90 | 146 | 120 | 160 | | |
| 78 | (82) | 72 | 120 | 114 | 134 | 174 | | |
| 78 | 72 | 78 | | | | | | |

LIITE 14

Kokeen 8 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|-----------------------------|----|---|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 13 | 5 | 1 | | 0.5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 11 | (28) | (48) | 15 | 8 | 20 | 9 |
| 9 | 10 | 36 | 30 | 3 | 18 | 0 |
| 0 | 21 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 7 | 0 | 90 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 12 | 16 | 105 | 0 | 1 | 0 |
| 0 | 8 | 0 | 120 | 2 | 0 | 0 |
| 0 | 3 | 3 | | 1.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 0 | 13 | 4 | | | | |
| 31 | 0 | 9 | 15 | 3 | 0 | 4 |
| (36) | 23 | 0 | 30 | 20 | 0 | 0 |
| 1 | 1 | 9 | 45 | 25 | 0 | 0 |
| 0 | 4 | 6 | 60 | 24 | 0 | 0 |
| 1 | 3 | 3 | | 10.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 0 | 12 | 0 | | | | |
| 5 | 6 | 3 | 15 | 27 | 16 | 2 |
| 2 | 0 | 0 | 30 | 59 | 28 | 9 |
| 0 | 14 | 0 | 45 | 42 | 0 | 0 |
| | | | 60 | 33 | 57 | 0 |
| | | | | † | † | † |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|-----------------------------|-----|-----|--|--|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | |
| (80) | (74) | 52 | | 0,5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | | | |
| 72 | 72 | 52 | 0 | 60 | 66 | 54 | | |
| 62 | 68 | 48 | 5 | 80 | 82 | 58 | | |
| 62 | 60 | 48 | 15 | 70 | 72 | 56 | | |
| 62 | 64 | 54 | 30 | 70 | 74 | 56 | | |
| 68 | 66 | 54 | 45 | 70 | 104 | 74 | | |
| 64 | 70 | 50 | 60 | 80 | 124 | 94 | | |
| 68 | 66 | 48 | 90 | 92 | 124 | 100 | | |
| 66 | 66 | (56) | 120 | 106 | 128 | 100 | | |
| 64 | 66 | 54 | | 1.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | | | |
| | | | 5 | 82 | 126 | 98 | | |
| | | | 15 | 112 | 126 | 106 | | |
| | | | 30 | 108 | 136 | 120 | | |
| | | | 45 | 110 | 136 | 118 | | |
| | | | 60 | 116 | 144 | 116 | | |
| | | | | 10.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | | | |
| | | | 5 | 146 | 148 | 138 | | |
| | | | 15 | 146 | 148 | 136 | | |
| | | | 30 | 108 | 140 | 130 | | |
| | | | 45 | 100 | 128 | 130 | | |
| | | | 60 | 90 | 106 | 124 | | |

Kokeen 9 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 2 | 0 | 0 | | 0.5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 14 | 15 | 0 | 0 | 33 |
| 0 | 4 | 4 | 30 | 0 | 0 | 19 |
| 7 | 5 | 0 | 45 | 0 | 10 | 4 |
| 0 | 0 | (32) | 60 | 5 | 0 | 2 |
| 0 | 1 | 0 | 75 | 20 | 0 | 9 |
| 19 | 0 | 24 | 90 | 0 | 0 | 4 |
| 8 | 0 | 16 | 105 | 3 | 0 | 0 |
| 0 | 6 | 27 | 120 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 15 | (14) | 0 | | | | |
| 3 | 7 | 5 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 8 | 3 | | | | |
| 0 | 5 | 7 | | | | |
| 14 | 0 | 0 | | | | |
| 10 | 0 | 0 | | | | |
| 19 | 14 | 0 | | | | |
| (24) | 9 | 7 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 78 | 74 | (80) | | 0.5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 78 | 74 | 78 | 0 | 66 | 86 | 76 |
| (80) | 76 | 74 | 5 | 62 | 76 | 96 |
| 78 | 74 | 72 | 15 | 64 | 74 | 100 |
| 72 | 80 | 72 | 30 | 66 | 76 | 100 |
| 74 | 78 | 76 | 45 | 76 | 80 | 100 |
| 74 | 78 | 76 | 60 | 84 | 110 | 100 |
| 72 | (84) | 78 | 90 | 120 | 116 | 112 |
| 74 | 78 | 76 | 120 | 124 | 114 | 112 |
| 74 | 80 | 76 | | | | |

LIITE 16

Kokeen 10 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|---|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 2 | 0 | 0 | | 1.5 mg l ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| 0 | 0 | 14 | 15 | 8 | 3 | 36 |
| 0 | 4 | 4 | 30 | 0 | 19 | 14 |
| 7 | 5 | 0 | 45 | 0 | 25 | 6 |
| 0 | 0 | (32) | 60 | 1 | 10 | 2 |
| 0 | 1 | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 24 | 90 | 0 | 15 | 0 |
| 8 | 0 | 16 | 105 | 0 | 17 | 0 |
| 0 | 6 | 27 | 120 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 15 | (14) | 0 | | | | |
| 3 | 7 | 5 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 8 | 3 | | | | |
| 0 | 5 | 7 | | | | |
| 14 | 0 | 0 | | | | |
| 10 | 0 | 0 | | | | |
| 19 | 14 | 0 | | | | |
| (24) | 9 | 7 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|---|----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 78 | 74 | (80) | | 1.5 mg l ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| 78 | 74 | 78 | 0 | 60 | 76 | 92 |
| (80) | 76 | 74 | 5 | 54 | 68 | 100 |
| 78 | 74 | 72 | 15 | 54 | 68 | 100 |
| 72 | 80 | 72 | 30 | 58 | 68 | 110 |
| 74 | 78 | 76 | 45 | 76 | 68 | 110 |
| 74 | 78 | 76 | 60 | 110 | 80 | 100 |
| 72 | (84) | 78 | 90 | 120 | 90 | 120 |
| 74 | 78 | 76 | 120 | 116 | 90 | 126 |
| 74 | 80 | 76 | | | | |

Kokeen 11 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. . | | | | | | |
|-----------------------|----|----|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 0 | | 1.5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 32 | 40 |
| 0 | 0 | 8 | 30 | 0 | 44 | 43 |
| 0 | 0 | 12 | 45 | 0 | 51 | 21 |
| 0 | 15 | 0 | 60 | 0 | 48 | 38 |
| 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 20 | 33 |
| 0 | 0 | 7 | 90 | 2 | 8 | 46 |
| ⑥ | 15 | 0 | 105 | 0 | 22 | 39 |
| 0 | 0 | 0 | 120 | 0 | 14 | 40 |
| 0 | 0 | 0 | | † | | |
| 0 | ③③ | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 4 | | | | |
| 2 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 14 | | | | |
| 0 | 15 | 5 | | | | |
| 0 | 24 | 0 | | | | |
| 0 | 30 | 6 | | | | |
| 0 | 0 | 14 | | | | |
| 0 | 0 | ②① | | | | |
| 0 | 24 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|----|----|------------------------|----------------------------|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 66 | 62 | 62 | | 1.5 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 64 | 62 | 62 | 0 | 62 | 62 | 60 |
| 66 | 62 | 62 | 5 | 62 | 62 | 60 |
| 64 | 66 | ⑦② | 15 | 62 | 64 | 64 |
| 66 | 64 | 68 | 30 | 62 | 62 | 60 |
| ⑦① | ⑥⑧ | 60 | 45 | 76 | 76 | 64 |
| 62 | 66 | 58 | 60 | 104 | 90 | 84 |
| 62 | 62 | 60 | 90 | 110 | 110 | 138 |
| 64 | 64 | 60 | 120 | 120 | 124 | 112 |
| 62 | 62 | 62 | | | | |

LIITE 18

Kokeen 12 tulokset.

PULSSIMÄÄRÄ/15 min.
normaalioloissa kokeen aikana

| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
|------|------|------|------------------------|---------------------------------------|---|----|
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| - | 0 | 0 | | 3.0 mg ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| - | 0 | 0 | 15 | - | 1 | 4 |
| - | 0 | 8 | 30 | - | 0 | 3 |
| - | 0 | 12 | 45 | - | 0 | 5 |
| - | 15 | 0 | 60 | - | 0 | 7 |
| - | 0 | 0 | 75 | - | 0 | 0 |
| - | 15 | 7 | 90 | - | 0 | 0 |
| - | 0 | 0 | 105 | - | 0 | 7 |
| - | (33) | 0 | 120 | - | 2 | 10 |
| - | 0 | 0 | | | | |
| - | 0 | 4 | | | | |
| - | 0 | 0 | | | | |
| - | 15 | 14 | | | | |
| - | 24 | 5 | | | | |
| - | 30 | 0 | | | | |
| - | 0 | 6 | | | | |
| - | 0 | 14 | | | | |
| - | 0 | (20) | | | | |
| - | 24 | 0 | | | | |

HENGITYSFREKVENSSI (min.⁻¹)
normaalioloissa kokeen aikana

| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
|------|------|------|------------------------|---------------------------------------|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| - | 62 | 62 | | 3.0 mg ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| - | 62 | 62 | 0 | - | 62 | 62 |
| - | 62 | 62 | 5 | - | 62 | 62 |
| - | 66 | (72) | 15 | - | 62 | 62 |
| - | 64 | 68 | 30 | - | 62 | 70 |
| - | (68) | 60 | 45 | - | 90 | 64 |
| - | 66 | 58 | 60 | - | 140 | 70 |
| - | 62 | 60 | 90 | - | 150 | 98 |
| - | 64 | 60 | 120 | - | 160 | 110 |
| - | 62 | 62 | | | | |

Kokeen 13 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|-----|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 16 | 0 | | 1.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 2 | 0 | 3 | 15 | 6 | 14 | 2 |
| 0 | 3 | 0 | 30 | 7 | 12 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 45 | 19 | 58 | 0 |
| 2 | 2 | 0 | 60 | 1 | 44 | 0 |
| 1 | 4 | (8) | 75 | 16 | 1 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 90 | 29 | 1 | 0 |
| 0 | 2 | 7 | 105 | 19 | 1 | 0 |
| 0 | 13 | 0 | 120 | 3 | 0 | 11 |
| 6 | (20) | 0 | | 2.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| (13) | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 8 | 8 | 45 | 6 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 60 | 2 | 1 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | | † | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 3 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|-----|---------|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| (48) | (64) | 82 | | 1.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 46 | 64 | 82 | | 0 | 50 | 56 86 |
| 46 | 62 | 80 | | 5 | 50 | 66 100 |
| 48 | 64 | 84 | | 15 | 54 | 66 100 |
| 48 | 60 | 80 | | 30 | 56 | 64 100 |
| 48 | 62 | 82 | | 45 | 60 | 76 100 |
| 48 | 64 | 82 | | 60 | 72 | 96 100 |
| 46 | 58 | 80 | | 90 | 118 | 110 126 |
| 48 | 56 | 80 | | 120 | 148 | 140 140 |
| 48 | 56 | (86) | | | | |
| | | | | 2.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| | | | | 5 | 130 | 140 152 |
| | | | | 15 | 132 | 104 146 |
| | | | | 30 | 140 | 120 130 |
| | | | | 45 | 146 | 130 130 |
| | | | | 60 | 150 | 146 134 |

LIITE 20

Kokeen 14 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|---|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 8 | | 1.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 7 | 0 | 30 |
| 0 | 0 | 4 | 30 | 17 | 1 | 3 |
| 0 | 2 | 0 | 45 | 36 | 20 | 4 |
| 7 | 14 | 0 | 60 | 22 | 16 | 1 |
| 0 | 5 | 0 | 75 | 1 | 2 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 90 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 3 | 105 | 0 | 5 | 0 |
| 12 | 2 | 12 | 120 | 0 | 7 | 0 |
| (21) | 1 | 10 | | | | |
| 9 | 0 | 8 | | | | |
| 0 | 0 | 13 | | | | |
| 0 | 0 | 12 | | | | |
| 0 | 0 | (21) | | | | |
| 0 | 10 | 0 | | | | |
| 2 | 0 | 13 | | | | |
| 1 | (18) | 8 | | | | |
| 8 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 6 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|---|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| (98) | 82 | (68) | | 1.0 mg l ⁻¹ Zn ²⁺ | | |
| 90 | (90) | 68 | 0 | 68 | 58 | 58 |
| 84 | 74 | 60 | 5 | 68 | 58 | 60 |
| 84 | 72 | 64 | 15 | 68 | 68 | 64 |
| 78 | 72 | 62 | 30 | 76 | 76 | 76 |
| 80 | 86 | 64 | 45 | 110 | 86 | 122 |
| 80 | 72 | 62 | 60 | 136 | 88 | 124 |
| 90 | 64 | 64 | 90 | 136 | 88 | 126 |
| 86 | 72 | 64 | 120 | 147 | 134 | 138 |
| 84 | 74 | 62 | | | | |

Kokeen 19 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|---|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 8 | 0 | 0 | | 0,1 mg l ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| 13 | 0 | 0 | 15 | 7 | 1 | 8 |
| 10 | 0 | 0 | 30 | 8 | 4 | 0 |
| 0 | 2 | 4 | 45 | 14 | 0 | 0 |
| 8 | 3 | 0 | 60 | 13 | 9 | 8 |
| 11 | 15 | 25 | 75 | 29 | 17 | 21 |
| 6 | 0 | 13 | 90 | 28 | 37 | 2 |
| 9 | 6 | 13 | 105 | 14 | 57 | 14 |
| 8 | 0 | 0 | 120 | 17 | 30 | 5 |
| 19 | 0 | 0 | | | | |
| (37) | 0 | 0 | | | | |
| 16 | 9 | 0 | | | | |
| 0 | 6 | (42) | | | | |
| 0 | 17 | 0 | | | | |
| 0 | (63) | 15 | | | | |
| 0 | 3 | 5 | | | | |
| 17 | 0 | 13 | | | | |
| 0 | 29 | 25 | | | | |
| 0 | 0 | 6 | | | | |
| 14 | 0 | 12 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. ⁻¹) | | | | | | |
|--|------|------|------------------------|---|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 68 | 68 | 70 | | 0.1 mg l ⁻¹ Cu ²⁺ | | |
| 70 | 78 | 70 | 0 | 82 | 84 | 88 |
| 68 | 86 | 86 | 5 | 80 | 94 | 96 |
| (86) | 82 | (96) | 15 | 80 | 78 | 96 |
| 80 | 78 | 92 | 30 | 80 | 80 | 94 |
| 78 | 88 | 88 | 45 | 84 | 82 | 94 |
| 86 | (96) | 92 | 60 | 80 | 82 | 94 |
| 84 | 90 | 88 | 90 | 86 | 80 | 88 |
| 66 | 86 | 96 | 120 | 86 | 78 | 88 |
| 82 | 84 | 96 | | | | |

LIITE 22

Kokeen 20 tulokset.

| PULSSIMÄÄRÄ/15 min. | | | | | | |
|---------------------|------|------|------------------------|----------------------------|----|----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 0 | 3 | | 5.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 6 | 14 |
| 3 | 15 | 9 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 1 |
| 0 | 2 | 0 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 6 | 4 | 75 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 16 | 90 | 1 | 0 | 4 |
| 0 | 3 | 6 | 105 | 2 | 4 | 5 |
| 0 | 0 | (21) | 120 | 0 | 42 | 9 |
| (23) | 0 | 0 | | † | † | † |
| 0 | (26) | 5 | | | | |
| 0 | 10 | 0 | | | | |
| 2 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 2 | | | | |
| 7 | 11 | 3 | | | | |
| 0 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 3 | 0 | | | | |
| 0 | 13 | 0 | | | | |
| -2 | 0 | 0 | | | | |
| 0 | 0 | 1 | | | | |

| HENGITYSFREKVENSSI (min. $^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------------------------|----------------------------|-----|-----|
| normaalioloissa | | | kokeen aikana | | | |
| kala | | | koe- aika (min.) | kala | | |
| 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| (80) | 84 | 70 | | 5.0 mg l^{-1} Cu $^{2+}$ | | |
| 80 | 84 | 70 | 0 | 72 | 84 | 80 |
| 78 | 90 | 68 | 5 | 92 | 92 | 86 |
| 80 | 92 | 70 | 15 | 144 | 152 | 150 |
| 70 | 88 | 70 | 30 | 142 | 166 | 166 |
| 72 | 90 | (72) | 45 | 150 | 182 | 160 |
| 70 | (96) | 68 | 60 | 144 | 186 | 158 |
| 68 | 86 | 68 | 90 | 144 | 176 | 154 |
| 70 | 82 | 68 | 120 | 144 | 170 | 150 |
| 70 | 82 | 70 | | | | |

Koekalojen hengitysfrekvenssien väliset korrelaatiokertoimet normaalioloissa (10 havaintoa) ja kokeen aikana (7 havaintoa).

| | | | | korrelaatiokerroin (r) lisätty pitoisuus | | |
|---------|-------|--------|--|--|------------------|-----------------------|
| | | | | normaali- oloissa | kokeen aikana | (mg l ⁻¹) |
| Koe 1. | Kalat | 1 ja 2 | | -0,25 | 0,82 * | 3,0 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,14 | 0,81 * | |
| | | 2 ja 3 | | 0,28 | 0,96 *** | |
| Koe 2. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,52 | 0,89 ** | 0,5 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 2 | | -0,34 | 0,12 | |
| | | 2 ja 3 | | 0,24 | 0,51 | |
| Koe 3. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,74 * | 0,86 * | 0,1 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,29 | 0,54 | |
| | | 2 ja 3 | | 0,12 | 0,61 | |
| Koe 4. | Kalat | 1 ja 2 | | -0,22 | 0,78 * | 0,5 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,12 | -0,30 | |
| | | 2 ja 3 | | 0,67 * | 0,30 | |
| Koe 5. | Kalat | 1 ja 2 | | -0,22 | 0,57 | 0,5 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,12 | -0,53 | |
| | | 1 ja 3 | | 0,67 * | -0,45 | |
| Koe 6. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,45 | 0,64 | 2,0 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,39 | 0,85 * | |
| | | 2 ja 3 | | 0,40 | 0,93 ** | |
| Koe 7. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,45 | 0,21 | 3,0 Zn ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,39 | -0,40 | |
| | | 2 ja 3 | | 0,40 | 0,21 | |
| Koe 8. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,75 * | 0,74 | 0,5 Cu ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,15 | 0,78 * | |
| | | 2 ja 3 | | 0,08 | 0,99 *** | |
| Koe 9. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,85 ** | 0,91 ** | 0,5 Cu ²⁺ |
| | | 1 ja 3 | | 0,04 | 0,96 *** | |
| | | 2 ja 3 | | -0,01 | 0,80 * | |
| Koe 10. | Kalat | 1 ja 2 | | 0,85 ** | 0,94 *** | 1,5 Cu ²⁺ |
| | | 1 ja 2 | | 0,04 | 0,64 | |
| | | 2 ja 3 | | -0,01 | 0,73 | |

| korrelaatiokerroin (r) lisätty pitoisuus (mg l ⁻¹) | | | |
|---|----------------------|------------------|-----------------------|
| | normaali- oloissa | kokeen aikana | |
| Koe 11. Kalat 1 ja 2 | 0,43 | 0,97*** | 1,5 Cu ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,09 | 0,87* | |
| 2 ja 3 | 0,11 | 0,90** | |
| Koe 12. Kalat 2 ja 3 | 0,11 | 0,83* | |
| Koe 13. Kalat 1 ja 2 | -0,07 | 0,97*** | 1,0 Cu ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,39 | 0,98*** | |
| 2 ja 3 | 0,03 | 0,92** | |
| Koe 14. Kalat 1 ja 2 | 0,22 | 0,82* | 1,0 Cu ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,74* | 0,97*** | |
| 2 ja 3 | 0,60 | 0,81* | |
| Koe 15. Kalat 1 ja 2 | 0,88*** | 0,98*** | 3,0 Zn ²⁺ |
| 1 ja 3 | -0,28 | 0,91** | |
| 2 ja 3 | -0,07 | 0,96*** | |
| Koe 16. Kalat 1 ja 2 | 0,08 | 0,79* | 10,0 Zn ²⁺ |
| 1 ja 3 | -0,15 | 0,86* | |
| 2 ja 3 | -0,20 | 0,93*** | |
| Koe 17. Kalat 1 ja 2 | 0,84** | 0,81* | 3,0 Zn ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,54 | 0,79* | |
| 2 ja 3 | 0,36 | 0,36 | |
| Koe 18. Kalat 1 ja 2 | -0,08 | 0,73 | 10,0 Zn ²⁺ |
| 1 ja 2 | -0,55 | 0,58 | |
| 2 ja 3 | 0,20 | 0,93*** | |
| Koe 19. Kalat 1 ja 2 | 0,47 | -0,37 | 0,1 Cu ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,53 | -0,89** | |
| 2 ja 3 | 0,61 | 0,46 | |
| Koe 20. Kalat 1 ja 2 | 0,03 | 0,95** | 5,0 Cu ²⁺ |
| 1 ja 3 | 0,24 | 0,97*** | |
| 2 ja 3 | -0,06 | 0,94** | |

* = eroaa nolasta melkein merkittävästi

** = eroaa nolasta merkittävästi

*** = eroaa nolasta erittäin merkittävästi